# Die Wirkung von Fütterungszusätzen und Stalldesinfektionsmitteln auf die Methangärung

Dissertation

Reinhold Hilpert

---

~~Dezember 1983~~
1984

Diss. München

PUBLIC
LIBRARY

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534907_0006

# Die Wirkung von Fütterungszusätzen und Stalldesinfektionsmitteln auf die Methangärung

Dissertation
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Reinhold Hilpert
aus
Kaufbeuren/Allgäu

---

Dezember 1983

1. Berichterstatter: Prof. Dr. O. Kandler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Böck

Tag der mündlichen Prüfung: 16. März 1984

# INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | Einführung | 1 |
| II. | Die Wirkung von Fütterungsantibiotika, synthetischen Fütterungszusätzen und Stalldesinfektionsmitteln auf die Vergärung organischer Abfallstoffe | 7 |
| II. 1. | Einleitung | 8 |
| II. 1. 1. | Fütterungsantibiotika | 9 |
| II. 1. 2. | Synthetische Chemotherapeutica | 11 |
| II. 1. 3. | Stalldesinfektionsmittel | 12 |
| II. 2. | Material und Methoden | 16 |
| II. 2. 1. | Zusammensetzung und Vorbehandlung des Schlammes | 16 |
| II. 2. 2. | Aufbau der Kleinfermenteranlage | 17 |
| II. 2. 3. | Durchführung der Standversuche | 18 |
| II. 2. 4. | Analytik | 18 |
| II. 2. 5. | Hemmstoffe | 23 |
| II. 3. | Ergebnisse | 24 |
| II. 3. 1. | Antibiotika | 24 |
| II. 3. 2. | Synthetische Chemotherapeutica | 38 |
| II. 3. 3. | Desinfektionsmittel | 42 |
| II. 4. | Diskussion | 43 |
| II. 4. 1. | Beurteilung der Standversuche als Testverfahren für die Praxis | 43 |
| II. 4. 2. | Wirkungen von Hemmstoffen der bakteriellen Zellwandbiosynthese | 44 |
| II. 4. 3. | Wirkungen von Hemmstoffen der bakteriellen Proteinbiosynthese | 45 |
| II. 4. 4. | Wirkungen von Ionophoren | 46 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| II. 4. 5. | Wirkung von synthetischen Chemotherapeutica..... | 50 |
| II. 4. 6. | Wirkung von Stalldesinfektionsmitteln..... | 51 |
| III. | Die Wirkung der ionophoren Antibiotika Monensin und Lasalocid auf Reinkulturen methanogener Bakterien..... | 52 |
| III. 1. | Einleitung..... | 53 |
| III. 2. | Material und Methoden..... | 55 |
| III. 2. 1. | Organismen..... | 55 |
| III. 2. 2. | Hemmstoffe..... | 55 |
| III. 2. 3. | Medien..... | 56 |
| III. 2. 4. | Analytik..... | 58 |
| III. 2. 5. | Versuchsdurchführung..... | 59 |
| III. 3. | Ergebnisse..... | 63 |
| III. 3. 1. | Hemmung des Wachstums methanogener Bakterien durch Monensin und Lasalocid..... | 63 |
| III. 3. 2. | Versuche zum Abbau der Hemmstoffe und zur Selektion resistenter Zellen..... | 66 |
| III. 3. 3. | Austritt von Kationen aus Zellen methanogener Bakterien unter dem Einfluß von Monensin oder Lasalocid..... | 70 |
| III. 3. 4. | Effekt von Monensin und Lasalocid auf die Methanbildung..... | 73 |
| III. 3. 5. | Wirkung der Hemmstoffe auf den ATP-Gehalt methanogener Bakterien..... | 80 |
| III. 3. 6. | Einfluß der Dichte der Zellsuspensionen auf die Methanbildungsrate..... | 83 |
| III. 4. | Diskussion..... | 85 |
| III. 4. 1. | Die Wirkungen von Monensin und Lasalocid auf die Methangärung..... | 85 |
| III. 4. 2. | Wirkungsmechanismus von Monensin und Lasalocid..... | 87 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| IV. | Zusammenfassung..... | 91 |
| V. | Literaturverzeichnis..... | 94 |
| VI. | Anhang..... | 104 |

## ABKÜRZUNGEN

| | |
|---|---|
| Ars. | Arsanilsäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| CCCP | Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon |
| $C_{max}$ | Höchstkonzentration |
| CSB | Chemischer Sauerstoffbedarf |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| 2,4 DNP | 2,4 Dinitrophenol |
| DSM | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen |
| DVG | Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft |
| FID | Flame Ionization Detector |
| Fur. | Furazolidon |
| GV | Großvieheinheit |
| h | Stunde(n) |
| LA | Landesanstalt |
| Mb. | Methanobacterium |
| Mbr. | Methanobrevibacter |
| Mc. | Methanococcus |
| Msc. | Methanosarcina |
| Msp. | Methanospirillum |
| OD | Optische Dichte |
| oTS | organische Trockensubstanz |
| p-ABS. | para-Aminobenzoesäure |
| PCP | Pentachlorphenol |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| SKE | Steinkohleeinheiten |
| Sulf. | Sulfamethazin |
| TCD | Thermal Conductivity Detector |
| TS | Trockensubstanz |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |

## I. EINFÜHRUNG

Die Methangärung ist ein wichtiger Prozess im natürlichen Stoffkreislauf. Durch sie wird der beim anaeroben Abbau von organischem Material in Form von Kohlendioxid, organischen Säuren und Alkoholen anfallende Kohlenstoff in Methan übergeführt, welches letztendlich entweder durch die Tätigkeit aerober, methylotropher Mikroorganismen oder durch Photooxidation in den höheren Schichten der Atmosphäre zu Kohlendioxid oxidiert wird (Wolfe, 1979). Dieses wiederum steht nun den photosynthetisch aktiven Organismen zur Bildung neuer Zellsubstanz zur Verfügung. Durch die Methangärung wird also auch der unter anaeroben Bedingungen stattfindende Abbau von organischem Material vollständig in den Kreislauf des Kohlenstoffs eingebunden (Kandler et al., 1983).

In der Natur findet die Vergärung von organischer Substanz zu Methan in verschiedenen, strikt anaeroben Lebensräumen statt, die sich in zwei Gruppen unterteilen lassen. Es sind dies zum einen aquatische Sedimente, Sümpfe, Reisfelder und Wattenmeere, zum anderen der Verdauungstrakt von Tieren, speziell der Pansen von Wiederkäuern (Mah et al., 1977; Zeikus, 1979; Wolfe, 1979). Ein dritter Lebensraum, in dem Methan aus Wasserstoff und Kohlendioxid anorganischen Ursprungs gebildet wird, nämlich geothermale Quellen, sei hier nur am Rande erwähnt.

Die genannten Ökosysteme unterscheiden sich hinsichtlich der bei der Methanisierung von komplexem organischen Material stattfindenden Abbaureaktionen und dementsprechend auch hinsichtlich der daran beteiligten Mikroorganismen. In der ersten Gruppe von Lebensräumen läuft die Methangärung in drei Stufen ab, wobei vier Gruppen von Mikroorganismen beteiligt sind (Abb. 1; siehe auch Soutschek, 1982; Kandler et al., 1983).

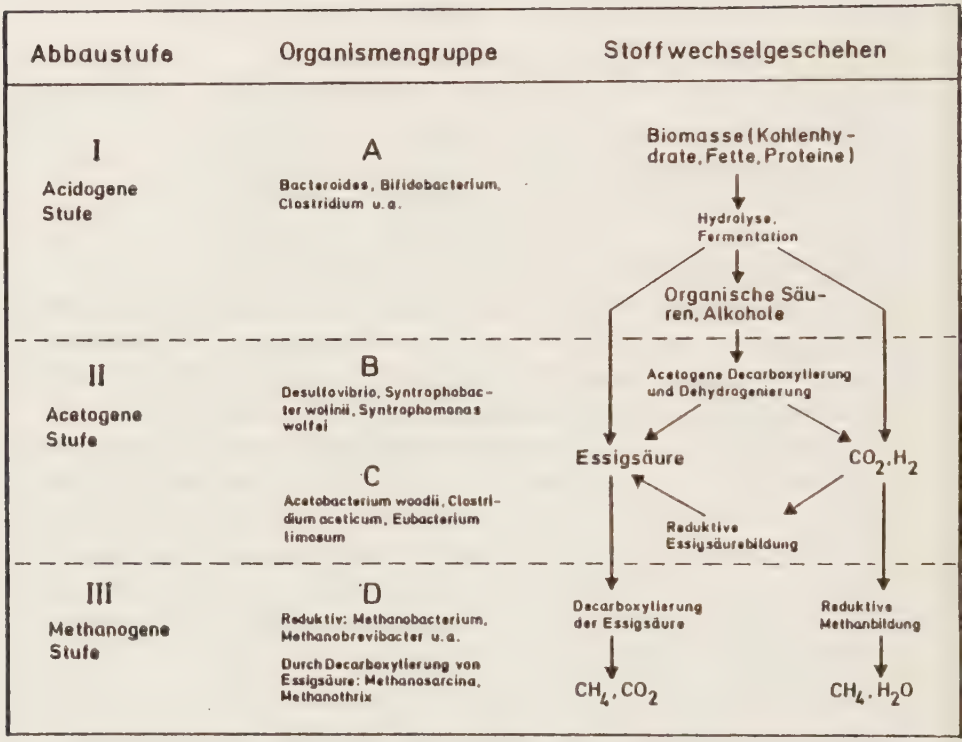


Abb. 1: Abbau von organischem Material unter anaeroben Bedingungen (aus Kandler et al., 1983; verändert).

In der ersten Stufe werden die Biopolymere zu Monomeren hydrolysiert und diese anschließend zu niederkettigen organischen Säuren, Alkoholen, Kohlendioxid und Wasserstoff fermentiert, woran Mikroorganismen wie Clostridium, Bacteroides, Bifidobacterium und andere beteiligt sind (Organismen der Gruppe A). Aufgrund der gebildeten Säuren wird dieser Schritt die "acidogene" Stufe genannt.

In der zweiten, der "acetogenen" Abbaustufe, werden diese Substrate in Essigsäure, Kohlendioxid und Wasserstoff übergeführt. An der Essigsäurebildung sind zwei Gruppen von Mikroorganismen beteiligt:

Die Organismen der Gruppe B bilden Essigsäure durch Decarboxylierungs- und Dehydrogenierungsreaktionen aus längerkettigen Säuren wie Lactat, Propionat, Butyrat und anderen. Hierzu gehören Desulfovibrio, Syntrophobacter wolinii und Syntrophomonas wolfei (Boone und Bryant, 1980; McInerney et al., 1981). Zusätzlich kann in der acetogenen Stufe durch Mikroorganismen der Gruppe C (Acetobacterium woodii, Clostridium aceticum, Eubacterium limosum) Essigsäure auch aus Kohlendioxid und Wasserstoff gebildet werden (Balch et al., 1977; Braun et al., 1979; Sharak Genthner et al., 1981).
In der dritten, der "methanogenen" Stufe schließlich, werden die bei den vorangegangenen Umsetzungen gebildeten Substrate Essigsäure, Ameisensäure, Kohlendioxid und Wasserstoff von den methanogenen Bakterien (Gruppe D) zu Methan umgesetzt. Hierbei ist zwischen reduktiver Methanbildung aus Kohlendioxid und Wasserstoff oder aus Formiat (Methanobacterium, Methanobrevibacter) und Acetat-Decarboxylierung (Methanosarcina, Methanothrix) zu unterscheiden (Wolfe, 1979; Thauer und Fuchs, 1979; Kandler et al., 1983).

In den Lebensräumen der zweiten Gruppe, also Pansen und Enddarm, sind nicht alle oben beschriebenen Abbaustufen ausgeprägt. Hier werden die Hauptprodukte des ersten Schrittes, nämlich Essig-, Propion- und Buttersäure, vom Wirtstier resorbiert und so dem Gärprozess entzogen. Dementsprechend sind auch nur die erste und dritte Abbaustufe von Bedeutung, während die zweite, "acetogene" Stufe in den Hintergrund tritt. Ebenso spielt hier auch die Bildung von Methan aus Essigsäure keine Rolle (Bryant, 1977; Wolin, 1981).

Der Mensch hat sich die Methangärung bei der Behandlung und Verwertung von organischen Abfällen in Faultürmen, Biogasanlagen oder ländlichen Faulgruben nutzbar gemacht. Solche Faulräume müssen zu Ökosystemen der ersten Gruppe gerechnet werden, da hier Essigsäurebildung durch acetogene Bakterien stattfindet und dementsprechend auch die Methanbildung aus Essigsäure eine bedeutende Rolle spielt. Ca. 60 - 70% des in diesem Lebensraum gebildeten Methans stammen aus diesem Substrat (Mackie und Bry-

Hauptzweck der Behandlung von mit organischem Material hochbelasteten Abfallstoffen (Klärschlamm, tierische Exkremente, Abfälle der Lebensmittel-verarbeitenden Industrie usw.) in Faulräumen war und ist eine möglichst weitgehende Stabilisierung, d.h. eine Verringerung der fäulnisfähigen Inhaltsstoffe und damit eine Verminderung der Geruchsbelästigung beim Ausbringen der ausgefaulten Abfälle auf landwirtschaftliche Flächen oder bei der Lagerung in Deponien (Loll, 1978; Schoberth, 1978). Die Ausfaulung verbessert auch die Entwässerbarkeit der Abfallstoffe, was eine Verringerung der benötigten Lagervolumina oder Ausbringflächen zur Folge hat (cf. Roediger, 1967).

In neuerer Zeit gewinnt aufgrund der Suche nach alternativen Energiequellen auch das bei der Faulung gebildete Methan als Energieträger an Bedeutung (Märkl, 1980; Würch, 1982). Allerdings kann in einem Industrieland wie der Bundesrepublik Deutschland die Biogasproduktion keinen erheblichen Beitrag zur Gesamtenergieversorgung leisten, da im Vergleich zum Energiebedarf der Anfall von organischem Material gering ist und keine Flächen zur Erzeugung organischer Substanz rein zum Zwecke der Vergärung ("energy farming") vorhanden sind. Hierzu sei die folgende kurze Kalkulation angefügt:
Die Gesamtproduktion an Exkrementen aus Nutztierbeständen betrug 1980 in der BRD $211 \times 10^6$t (Strauch, 1982). Die für 1985 prognostizierte Menge an Klärschlamm beträgt $50 \times 10^6$t aus kommunalen und $30 \times 10^6$t aus industriellen Kläranlagen (Bundesministerium des Inneren, 1981). Bei einem durchschnittlichen Gehalt von 5% organischer Trockensubstanz (oTS) ergeben sich hieraus $14{,}6 \times 10^6$t oTS. Hinzu kommen Abfälle aus pflanzlicher Produktion, wovon Getreidestroh den Hauptanteil ausmacht (Winter und Wiegel, 1981). Nach Sahm (1979) fällt in der BRD jährlich ein Strohüberschuß von $5\text{-}8 \times 10^6$t oTS an. Bei einem in der Praxis möglichen 50%igen Abbau dieser Substrate errechnet sich eine jährliche Biogasproduktion von $9 \times 10^9 m^3$ (Faktor $0{,}8 m^3$ Biogas/kg oTS abgebaut; cf. Schoberth, 1978; Temper et al., 1982 ). Hieraus ergeben sich bei 70% Methananteil im Biogas (Sahm, 1979; Temper et al., 1982) ca. $6{,}3 \times 10^9 m^3$ Methan oder $6{,}8 \times 10^6$tSKE (SKE =

Steinkohleeinheiten; Umrechnungsfaktor $1m^3$ $CH_4$ = 1,08 kg SKE aus Reintges et al., 1979). Der Primärenergieverbrauch betrug 1981 in der BRD jedoch $373x10^6$tSKE (Fischer Weltalmanach, 1983); hieraus folgt, daß sich durch Vergärung eines Großteils der anfallenden organischen Abfallstoffe hierzulande nur ca. 1,8% des Primärenergiebedarfs decken ließen.

Ein wirtschaftlicher Einsatz der Biogastechnologie wird jedoch dort möglich sein, wo große Mengen organischer Abfälle auf begrenztem Raum anfallen, wie z.B. in Schlachthöfen, großen Kläranlagen, landwirtschaftlichen Großbetrieben usw. (Winter und Wiegel, 1981; Steiner und Kandler, 1983). Speziell bei der Intensivtierhaltung in der Landwirtschaft ist der Betrieb von Biogasanlagen angezeigt, da hier häufig die Geruchsbelästigung durch die großen Güllemengen ein Problem darstellt und oft auch ausreichende Flächen zur Gülleausbringung fehlen (Strauch, 1982).

Nun ist jedoch gerade bei der Intensivtierhaltung der Einsatz von Futterzusatzstoffen und Stalldesinfektionsmitteln zur Verbesserung der Futterverwertung bzw. zur Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten weit verbreitet (Beutin, 1981). Als Futterzusätze kommen Antibiotika mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen (ionophore Substanzen und Hemmstoffe der bakteriellen Zellwand- oder Proteinbiosynthese) und synthetische Chemotherapeutica, die entweder den Folsäurestoffwechsel beeinflussen oder mutagene Eigenschaften besitzen, zur Anwendung. Je nach Stabilität des eingesetzten Wirkstoffes bzw. seiner Resorption im Verdauungstrakt können mehr oder weniger große Mengen des Zusatzstoffes über die Ausscheidungen der Tiere in die Gülle gelangen. Ebenso kann eine stoßweise Belastung der Gülle mit Desinfektionsmitteln erfolgen, wenn größere Bereiche der Tierstallungen zusammenhängend desinfiziert werden müssen (z.B. vor der Neubelegung oder bei der Bekämpfung von Infektionskrankheiten). Wenn solchermaßen mit Hemmstoffen belastete Gülle in Biogasanlagen eingebracht wird, kann dies Störungen des Fermentationsprozesses zur Folge haben (Hilpert et al., 1983).

So trat z.B. während des Zeitraumes, in dem diese Arbeit verfaßt wurde, in einer mit Schweinegülle und Kartoffelschlempe betriebenen Biogasanlage in Gilching bei München eine Störung des Faulvorganges auf, die mit Sicherheit auf Fütterungszusätze zurückzuführen war, die dort zur Behandlung einer Ferkelgrippe an die Mastschweine verabreicht worden waren.

Es ergibt sich also die Notwendigkeit, eine möglichst große Anzahl in Anwendung befindlicher Fütterungszusätze und Stalldesinfektionsmittel hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Methangärung zu untersuchen. Weiterhin stellt sich, wenn eine Substanz eine Hemmwirkung ausübt, die Frage, auf welcher Stufe im komplexen Stoffwechselgeschehen die Hemmung stattfindet bzw. welche Organismengruppen auf welche Art und Weise betroffen sind. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, zur Klärung dieser Fragen beizutragen.

Im ersten Teil wird die Wirkung potentieller Hemmstoffe auf den Gesamtprozess untersucht, wobei einzelne Substanzen auch eingehender hinsichtlich ihres Wirkortes bzw. hinsichtlich der betroffenen Organismengruppen geprüft werden. Im zweiten Teil wird über die Wirkungen zweier ionophorer Substanzen, Monensin und Lasalocid, die in der Tierfütterung verbreitet eingesetzt werden und in den Untersuchungen am Gesamtprozess der Methangärung interessante Effekte zeigten, auf Reinkulturen methanogener Bakterien, also auf die Organismen der dritten Abbaustufe, berichtet.

## II. DIE WIRKUNG VON FÜTTERUNGSANTIBIOTIKA, SYNTHETISCHEN FÜTTERUNGSZUSÄTZEN UND STALLDESINFEKTIONSMITTELN AUF DIE VERGÄRUNG ORGANISCHER ABFALLSTOFFE

## II. 1. Einleitung

Die Technisierungs- und Rationalisierungsbestrebungen in der Nutztierhaltung haben in den vergangenen Jahrzehnten zu einer ständigen Vergrößerung der Tierbestände bei Geflügel, Schweinen und Rindern geführt, was eine entsprechende Zunahme von tierischen Exkrementen im landwirtschaftlichen Großbetrieb zur Folge hatte (Strauch, 1982). Auf die nutzbringende Anwendung der Biogastechnologie bei der Stabilisierung und Verwertung dieser Abfälle wurde bereits in der Einführung hingewiesen, ebenso wie auf die Möglichkeit einer Störung des Faulprozesses durch in der Gülle enthaltene Hemmstoffe. Anhand der folgenden Beispiele möchte ich zeigen, daß bei Anwendung von Fütterungszusätzen eine Belastung der Tierexkremente mit dem eingesetzten Hemmstoff tatsächlich erfolgt.

Für das in der Rindermast häufig verwendete Monensin ist z.B. bekannt, daß 40% der eingesetzten Menge unverändert im Kot der Masttiere wieder ausgeschieden werden (Donoho et al.,1978). Im Falle von Lasalocid kann bei Anwendung in der Hühnermast die Konzentration des Hemmstoffes in den Ausscheidungen der Tiere, abhängig von deren Alter, bis zu 6ppm betragen (Hoffmann-La Roche, 1980), und von dem bei der Schweinemast eingesetzten Virginiamycin findet man auch nach einigen Tagen Lagerung noch 20% der ursprünglichen Aktivität in der Gülle (Cocito, 1979).

Auch eine Kontamination der Gülle mit Stalldesinfektionsmitteln ist bei den heute größtenteils bestehenden Stallungen mit Teilspaltenböden und Schwemmentmistung nicht zu vermeiden.

Wenn nun solchermaßen hemmstoffbelastete Substrate in Biogasanlagen eingebracht werden, ist zu befürchten, daß sich Störungen im Gärprozess einstellen. Im Folgenden soll auf die drei Gruppen potentieller Hemmstoffe der Methangärung - Fütterungsantibiotika, synthetische Fütterungszusätze und Stalldesinfektionsmittel - näher eingegangen werden.

## II. 1. 1. Fütterungsantibiotika

Die in der Praxis eingesetzten Fütterungsantibiotika lassen sich aufgrund ihrer Wirkungsweise in Hemmstoffe der bakteriellen Zellwandbiosynthese, Hemmstoffe der bakteriellen Proteinbiosynthese und ionophore Substanzen, die Ionen- oder Protonengradienten an Zellmembranen beeinflussen, unterteilen. Tab. 1 gibt einen Überblick über einen Großteil der z.Zt. in der Praxis der Tierfütterung verwendeten Wirkstoffe.

Tab. 1: Fütterungsantibiotika

(Angaben aus Siewert und Strominger, 1967; Vazquez, 1975; Korzybski et al., 1978; Drews, 1979; Elanco, 1979; Huber, 1979; Reed, 1979; Burgstaller, 1980; Hoffmann-La Roche, 1980; Beutin, 1981)

| Wirkstoff | Stoffwechselprodukt von | Handelsname(n) | Anwendungsbereich | Wirkort/Wirkungsweise |
|---|---|---|---|---|
| Bacitracin | Bac. licheniformis | Zink-Bacitracin | Schweinemast | bakterielle Zellwandbiosynthese; Komplexbildung mit membrangebundenem Undecaprenylpyrophosphat |
| Flavomycin | Streptomyces bambergiensis | Flavophospholipol | Schweinemast Rindermast | bakterielle Zellwandbiosynthese; Hemmung der Übertragung von Disaccharid-Dekapeptiden auf die wachsende Peptidoglycankette |
| Lasalocid | Streptomyces lasaliensis | Bovatec Avatec | Rindermast Coccidiostaticum | Membranen; elektroneutraler Transport von Kationen |
| Monensin | Streptomyces cinnamonensis | Rumensin Elancoban, Coban, Monelan | Rindermast Coccidiostaticum | Membranen; elektroneutraler Transport von Kationen |
| Spiramycin | Streptomyces ambofaciens | Spiramix | Schweinemast | 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms; Störung der Bindung von Aminoacyl- t RNA an das Ribosom |
| Tylosin | Streptomyces fradiae | Tylan | Schweinemast | " |
| Virginiamycin | Streptomyces virginiae | Stafac | Schweinemast | " |

Der Ort, an dem die Fütterungszusätze ihre Wirkungen entfalten, die im Endeffekt zu einer verbesserten Futterverwertung führen, ist vermutlich in allen Fällen die Mikroflora im Verdauungstrakt

der Masttiere. Es ist jedoch, bis auf wenige Ausnahmen (siehe unten), nicht bekannt, welche primären Effekte dort durch die Hemmstoffe auf die Mikroorganismen ausgeübt werden (Beutin, 1981).

a) Hemmstoffe der bakteriellen Zellwandbiosynthese

Zwei Fütterungsantibiotika, nämlich Bacitracin und Flavomycin, gehören zu der Gruppe von Wirkstoffen, die die bakterielle Zellwandbiosynthese beeinflussen. Beide greifen in die an die Membran gebundenen Schritte bei der Peptidoglycansynthese ein (Siewert und Strominger, 1967; Huber, 1979).
In der BRD werden Flavomycin und Bacitracin in der Schweinemast eingesetzt. Flavomycin kommt auch in der Rindermast zur Anwendung, wo es beschleunigtes Wachstum der Tiere bei unveränderter Nahrungsaufnahme bewirkt, was zu einer Verkürzung der Mastdauer führt (G. Burgstaller, pers. Mitteilung).

b) Ionophore

Die Antibiotika Monensin und Lasalocid gehören zur Gruppe der ionophoren Wirkstoffe. Es handelt sich um Polyether, die elektroneutralen Transport von Kationen (oder Protonen) an Membranen bewirken. Die beiden Wirkstoffe unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Affinität für verschiedene Kationen. So kann Monensin nur einwertige Kationen anlagern, wobei für Natrium die größte Affinität besteht. Lasalocid kann ein- und zweiwertige Kationen binden und zeigt höhere Affinität zu Kalium als zu Natrium (Reed, 1979).
Die ionophoren Wirkstoffe werden in der Rindermast und als Coccidiostaticum bei Hühnern verwendet. In der BRD ist zum Einsatz in der Rindermast z.Zt. nur Monensin zugelassen. Der Wirkstoff bewirkt, anders als Flavomycin, eine Verringerung der Futteraufnahme bei gleichbleibender Wachstumsleistung und somit keine Reduktion der Mastdauer, sondern eine Einsparung von Futtermitteln (Elanco, 1979). In den USA und in der Schweiz wird auch Lasalocid bei der Rindermast eingesetzt.

Die Wirkungen von Monensin auf die Pansenfermentation wurden bereits eingehend untersucht. Der Hemmstoff bewirkt eine Zunah-

me des Anteils von Propionsäure an den Gärungssäuren im Pansen, eine Verringerung von Ammonium-Stickstoff in der Pansenflüssigkeit und eine Abnahme der Methanproduktion (Van Nevel und Demeyer,1977; Stanier und Davies, 1981). Diese Effekte führen zu einer besseren Futterverwertung durch das Masttier, da Kohlenstoffverluste im Pansen vermieden werden und da mit Propionsäure dasjenige Gärungsprodukt verstärkt gebildet wird, das als einziges der drei Hauptprodukte der Gärung (Essig-, Propion- und Buttersäure) zur Netto-Gluconeogenese im Masttier genutzt werden kann (Wolin, 1981).

Welche direkten Wirkungen von Monensin auf die Mikroflora im Pansen zu den beschriebenen Effekten führen, ist noch nicht endgültig geklärt. Chen und Wolin (1979) vermuten, daß der Hemmstoff eine Selektion von Propionsäurebildnern bedingt und daß Wasserstoff- und Ameisensäureproduzenten unterdrückt werden. Letzteres würde dann die beobachtete verringerte Methanproduktion bedingen (Verknappung methanogener Substrate).

c) Hemmstoffe der bakteriellen Proteinbiosynthese

Die drei Fütterungsantibiotika Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin sind Hemmstoffe der bakteriellen Proteinbiosynthese. Sie binden an die 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms und verhindern die korrekte Anlagerung von Aminoacyl-t-RNA, wodurch das Wachstum der entstehenden Polypeptidkette unterbunden wird (Cocito,1979; Drews, 1979).
Alle drei Wirkstoffe sind in Deutschland zur Verwendung in der Schweinemast zugelassen. Auch bei Kälbern oder Mastgeflügel wird eine verbesserte Futterverwertung unter dem Einfluß derartiger Wirkstoffe beobachtet (Cocito, 1979).

II. 1. 2. Synthetische Chemotherapeutica

Aus der Gruppe der synthetischen Chemotherapeutica werden mutagene Substanzen und Hemmstoffe der bakteriellen Folsäurebiosynthese als Fütterungszusätze verwendet.

a) Mutagene Hemmstoffe

Furazolidon ist ein Nitrofuranderivat, das durch die Aktivität bakterieller Reduktasen reduziert und hierdurch erst aktiviert wird. Vermutlich ist das eigentlich wirksame Molekül ein bei der Reduktion auftretendes Hydroxylradikal, das Brüche in der DNA hervorruft (Yahagi et al., 1974).
Olaquindox ist ein Quinoxalin-di-N-oxid, das ebenfalls erst durch Reduktion aktiviert wird und dann zu Brüchen in der DNA führt. Auch hier wird ein während der Reduktion auftretendes Radikal als wirksames Agens vermutet (Suter et al., 1978).

Ein prinzipielles Problem bei der Anwendung beider Hemmstoffe in der Tierfütterung ist, daß auch in Säugerzellen reduzierende Enzymsysteme sowohl für Nitrofurane als auch für Quinoxalin-di-N-oxide gefunden wurden, so daß die Wirkung beider Hemmstoffe nicht auf Bakterien beschränkt ist (Beutin, 1981). In Deutschland werden diese Substanzen in der Schweinemast verwendet, wo sie zu verbesserter Futterverwertung führen.

b) Hemmstoffe der Folsäurebiosynthese

Ein anderer Mechanismus liegt der Wirkung von Arsanilsäure und Sulfamethazin zugrunde. Diese Hemmstoffe sind Strukturanaloga der p-Aminobenzoesäure und greifen in den bakteriellen Folsäurestoffwechsel ein. Durch kompetitive Hemmung verhindern sie den Einbau von p-Aminobenzoesäure in das entstehende Folsäuremolekül und bewirken so die Bildung inaktiver, Folsäure-ähnlicher Verbindungen (Drews, 1979).
Auch diese Wirkstoffe werden in der BRD in der Schweinefütterung eingesetzt.

II. 1. 3. Stalldesinfektionsmittel

Als Stalldesinfektionsmittel wird eine ganze Reihe von Präparaten verschiedener Hersteller auf dem Markt angeboten. Eine Aufnahme dieser Präparate in die von der Deutschen Veterinär-

medizinischen Gesellschaft aufgestellte "Liste für geprüfte und als wirksam befundene Desinfektionsmittel für die Tierhaltung" gewährleistet, daß das jeweilige Mittel hinsichtlich seiner Wirksamkeit gegen verschiedene Krankheitserreger (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) in einheitlicher Weise geprüft und beurteilt wurde (DVG, 1979). Es ist jedoch zu beachten, daß dies keinerlei Bewertung der Unbedenklichkeit bei Anwendung oder Lagerung der Präparate beinhaltet.

Die handelsüblichen Stalldesinfektionsmittel enthalten verschiedene wirksame Komponenten wie Aldehyde, Alkohole, Phenole, quaternäre Ammoniumverbindungen, Chloroform und Schwefelkohlenstoff (siehe Tab. 2).
Die antibakterielle Wirkungsweise dieser Substanzen wird in der Literatur meist symptomatisch beschrieben. Aldehyde, Alkohole, Phenole und auch quaternäre Ammoniumverbindungen wirken denaturierend auf Proteine (Kuschinsky und Lüllmann, 1970). Im Falle der Alkohole beruht dieser Effekt auf Wasserentzug aus den Proteinmolekülen, Aldehyde können durch Bildung von Acetalen (Karrer, 1963) eine Vernetzung von Proteinen bewirken. Phenole bewirken neben Eiweißfällung auch das Austreten cytoplasmatischer Komponenten aus der Zelle, was zeigt, daß diese Stoffe auch membranzerstörende Wirkungen ausüben (Franklin und Snow, 1975).
Quaternäre Ammoniumverbindungen sind kationische, grenzflächenaktive Substanzen mit einer polaren Gruppe und vier hydrophoben Resten im Molekül. Aufgrund dieser Eigenschaften können sie Membranstrukturen beeinflussen, was wiederum durch das Austreten cytoplasmatischer Zellkomponenten festgestellt werden kann (Franklin und Snow, 1975). Die Protein-denaturierende Wirkung von quaternären Ammoniumverbindungen wurde an Blaualgen gezeigt (Metzner, 1977).
Chloroform und Schwefelkohlenstoff sind ausgezeichnete organische Lösungsmittel, die die Hüllen von Dauerformen parasitärer Krankheitserreger (z.B. Coccidien-Oocysten) zerstören können. Diese Inhaltsstoffe bewirken dementsprechend auch gute

antiparasitäre Eigenschaften eines Präparates (Enigk und Hilbrich, 1968).
Desinfektionsmittel mit oxidierenden Inhaltsstoffen (Chlor, $KMnO_4$, $H_2O_2$) werden durch hohe Konzentrationen organischen Materials rasch inaktiviert und sind dementsprechend nicht zur Stalldesinfektion geeignet. Derartige Präparate sind auch nicht in der DVG-Liste der geprüften Stalldesinfektionsmittel enthalten.

Angaben über Zusammensetzung und Wirkungsbereich der in dieser Arbeit geprüften Präparate können Tab. 2 entnommen werden.

Tab. 2: Stalldesinfektionsmittel. Auszug aus der "Liste für geprüfte und als wirksam befundene Desinfektionsmittel für die Tierhaltung" (DVG, 1979)

| Name | Hersteller bzw. Vertriebsfirma | Wirkstoffe | Gebrauchskonzentration und Mindesteinwirkungszeit | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Bakterizidie | | Fungizidie | | Viruzidie | | Antiparasitäre Wirkung |
| | | | spez. Des. | vorb. Des. | fungizid | begrenzt fungizid | viruzid | begrenzt viruzid | |
| Dekaseptol | Chem.Fabrik Harlenfelde 2 Hamburg 50 | Chloroform Schwefelkohlenstoff. Phenolderivate | | 2% 1h | | | | | 6% 1h |
| Incidin 03 | Henkel KG 4 Düsseldorf 1 | Aldehyde, Quart. Ammoniumverb. Alkohole | 2% 2h | 1% 1h | 2% 4h | 1% 2h | 3% 4h | 2% 1h | |
| Master-Mix- | Chem.Fabrik Wülfel 3 Hannover 89 | Phenol | | 2% 2h | | 2% 2h | | | |
| Orbivel | Schülke & Mayr GmbH 2 Norderstedt | Aldehyde Alkohole | 2% 2h oder 1% 4h | 1% 1h | 2% 2h | 1% 2h | 2% 2h | 1% 1h | |
| Tegodor 73 R | Th.Goldschmidt AG 43 Essen | Aldehyde, Quart. Ammoniumverb. | 2% 4h oder 4% 2h | 1% 2h oder 2% 1h | 3% 4h | 2% 2h | 2% 4h | 1% 1h | |

Im Folgenden wird über die Wirkungen von Fütterungsantibiotika, synthetischen Fütterungszusätzen und Stalldesinfektionsmitteln auf die Methangärung berichtet. Ein einfaches und schnelles Verfahren zur Untersuchung potentieller Hemmstoffe der Biogasproduktion wird beschrieben.

## II. 2. Material und Methoden

Die Untersuchungen der einzelnen Hemmstoffe wurden in 120ml-Serumfläschchen als Standversuche durchgeführt. Einige Wirkstoffe wurden zur weitergehenden Untersuchung auch in semikontinuierlich betriebenen Kleinfermentern geprüft. Als Modellsubstrat diente in beiden Fällen städtischer Klärschlamm aus der Kläranlage München-Großlappen.

### II. 2. 1. Zusammensetzung und Vorbehandlung des Schlammes

Der verwendete Klärschlamm ist ein Gemisch aus primärem Absetzschlamm, d.h. den Feststoffen, die in den Absetzbecken der Kläranlage sedimentieren, und aus Überschußschlamm, der bei der aeroben Behandlung von Abwasser im Belebungsbecken anfällt. Um während des gesamten Versuchszeitraumes ein möglichst gleichartiges Substrat zur Verfügung zu haben, wurden ca. 1000l Klärschlamm in großen Plastiktrögen gut gemischt und anschließend in 50l-Portionen mit Hilfe eines großen Ultra-Turrax (Typ T 65) 5 min homogenisiert. Dieses Homogenat wurde auf 1l-Plastikflaschen verteilt und bei -20°C gelagert. Zum Gebrauch wurden die einzelnen Portionen aufgetaut. Um ein Verstopfen von Schläuchen bei den Kleinfermentern (siehe unten) zu vermeiden, wurde der Schlamm nach dem Auftauen noch durch ein normales Küchensieb passiert. Die Zusammensetzung eines derart behandelten Schlammes ist in Tab. 3 angegeben.

Tab. 3: Beschaffenheit des verwendeten Klärschlammes

| Eigenschaft | Wert | Analysenmethode |
|---|---|---|
| Trockensubstanz (TS) | ca. 3% | Trocknung bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz |
| Organische Trockensubstanz (oTS) | 2,1-2,4% | Glührückstand nach 2h bei 550°C |
| Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB) | 39000 - 42000mg$O_2$/l | modifizierte Hach-Methode (Wolf und Nordmann, 1977) |
| pH-Wert | 5,8-6,2 | pH-Elektrode |
| Natriumgehalt | 3mmol/l | Messung im Flammenphotometer (Eppendorf) |
| Kaliumgehalt | 3mmol/l | " " |

II. 2. 2. Aufbau der Kleinfermenteranlage

Es wurden MULTIGEN-Fermenter (Fa. New Brunswick, New Jersey, USA) mit 1l Gesamtvolumen und 500ml Füllvolumen verwendet. Der Aufbau einer Fermentereinheit ist in Abb. 2 gezeigt.

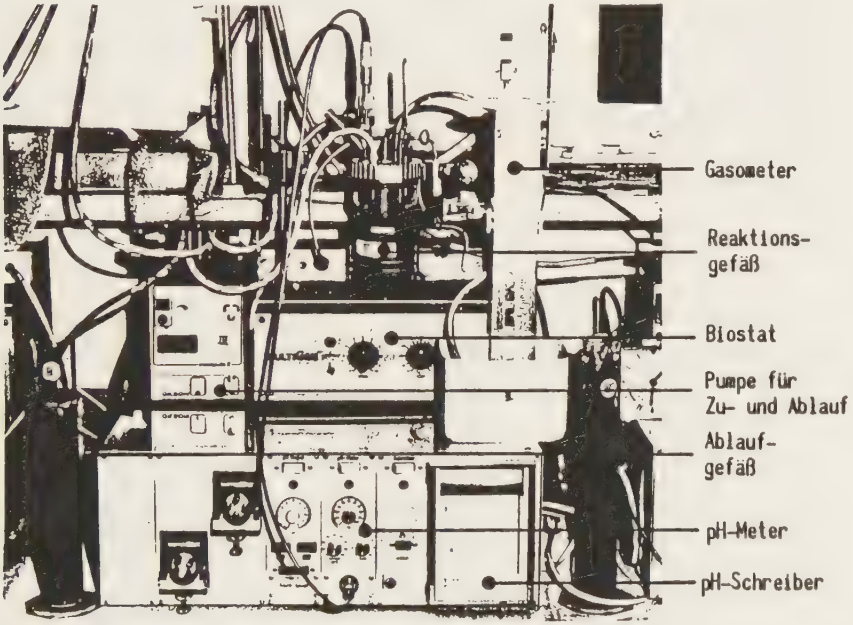


Abb. 2: Aufbau der Kleinfermenter (1 Einheit)

Täglich wurden 50ml vergorener Fermenterinhalt über Peristaltikpumpen (Gilson Minipuls 2) abgezogen und 50ml Frischschlamm zugeführt, sodaß sich eine Retentionszeit von 10 Tagen ergab. Anfangs wurde versucht, diesen Vorgang zu automatisieren (Einbau von Schaltuhren, gekühltes Vorratsgefäß für Frischschlamm, gleichzeitiges Zugeben und Abziehen von Frisch- und Altschlamm über 2 Schläuche im selben Pumpenkopf), jedoch erwies sich dies aufgrund stark schwankender Förderleistung der Pumpen unter den

gegebenen Bedingungen als nicht sinnvoll. Die Austauschvolumina wurden danach täglich genau abgemessen und der Pumpvorgang wurde von Hand gesteuert. Der Fermenterinhalt wurde bei einer Temperatur von 37°C ständig langsam gerührt (ca. 70U/min). Das gebildete Gas wurde in einfachen Verdrängungsgasometern aufgefangen. Der pH-Wert der Fermentationsflüssigkeit wurde über Einstabmeßketten (Fa. Ingold, Typ 465) kontinuierlich gemessen und auf einem pH-Meter mit Mehrfachschreiber (Fa. Braun, Melsungen) registriert. Hierbei ist zu beachten, daß die Lebensdauer solcher fest eingebauten pH-Elektroden begrenzt ist, sodaß die angezeigten Werte von Zeit zu Zeit mit einem externen pH-Meter überprüft werden müssen.

### II. 2. 3. Durchführung der Standversuche

80% vergorener Schlamm aus der Kleinfermenteranlage und 20% Frischschlamm wurden gemischt und in 30ml-Portionen auf 120ml-Serumflaschen verteilt. Diese wurden anschließend mit Hilfe eines Gummistopfens gasdicht verschlossen. Die Gasphase in den Flaschen wurde an einer Gasstation (Balch et al., 1979) durch $N_2$ (Druck 1bar) ersetzt. Mit Hilfe einer Spritze wurden die Hemmstofflösungen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Die Kontrollen erhielten entsprechende Mengen des jeweils verwendeten Lösungsmittels. Die Proben wurden unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden mit einer gasdicht verschließbaren Spritze definierte Mengen aus der Gasphase entnommen. Der Methangehalt dieser Proben wurde gaschromatographisch bestimmt.

### II. 2. 4. Analytik

a) Gaschromatographische Bestimmung von Gasen

| | |
|---|---|
| Gerät: | Packard GC 427 |
| Detektor: | TCD |
| Säule: | 180cm Edelstahl, Ø 1/8 Zoll |
| Füllmaterial: | Porapak N 80/100 |

Trägergas: $N_2$ (40ml/min) zur Bestimmung von $H_2$ und $CH_4$
oder He (40ml/min) zur Bestimmung von $CH_4$ und CO

Temperaturen: Säulenofen 110°C; Detektor und Injektor 150°C

Probevolumen: 0,3ml

Retentionszeiten: $H_2$ 19sec; $CH_4$ 27sec; $CO_2$ 43sec

In Abb. 3 ist die Trennung der Gase gezeigt.

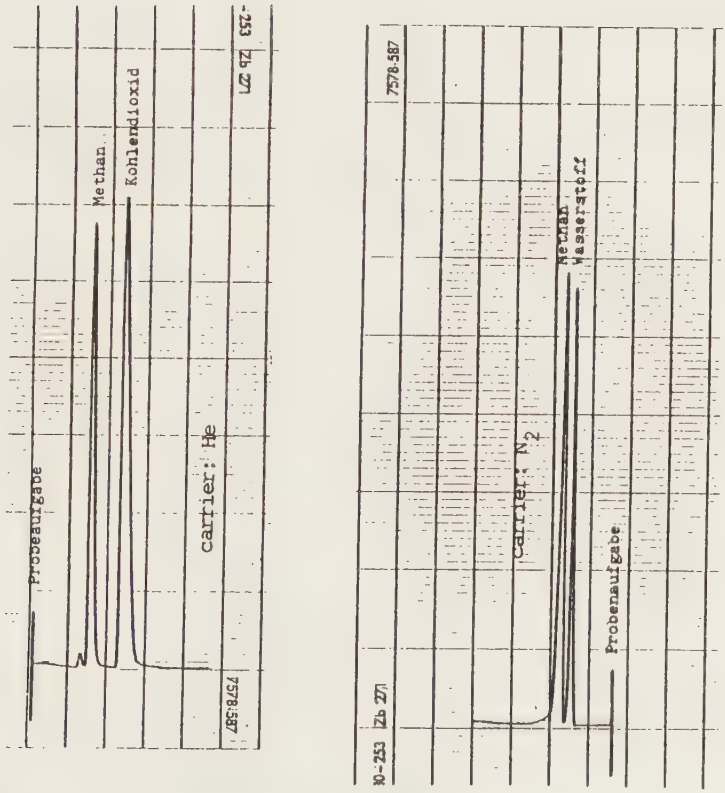


Abb. 3: Gaschromatographische Trennung von Wasserstoff, Methan und Kohlendioxid

b) Gaschromatographische Trennung der flüchtigen Fettsäuren

| | |
|---|---|
| Gerät: | Packard GC 433 oder Carlo Erba FTV 2150 |
| Detektor: | FID |
| Säule: | 180cm Edelstahl, ø 1/8 Zoll |
| Füllmaterial: | Chromosorb 101 80/100 |
| Trägergas: | $N_2$ (25ml/min) |
| Temperaturen: | Säulenofen 195°C; Detektor und Injektor 225°C |
| Probevolumen: | 2µl |
| Probenvorbehandlung: | 1ml der Probe wurde 2min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der klare Überstand wurde mit 10µl 50% $H_2SO_4$ angesäuert und anschließend direkt auf die Säule injiziert. |
| Retentionszeiten: | Essigsäure 150sec; Propionsäure 258sec; iso-Buttersäure 372sec; n-Buttersäure 438sec; iso-Valeriansäure 660sec; n-Valeriansäure 804 sec; iso-Capronsäure 1248sec; n-Capronsäure 1488sec |

In Abb. 4 ist die Trennung der flüchtigen Säuren gezeigt.

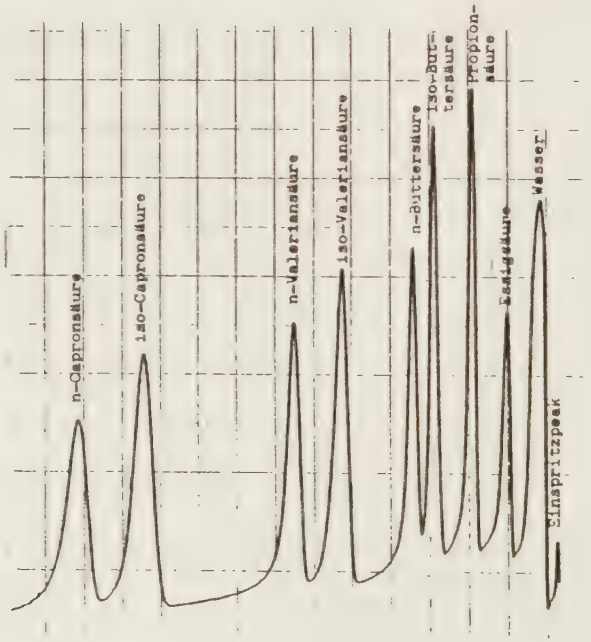


Abb. 4: Gaschromatographische Trennung der flüchtigen Fettsäuren

c) Koloniezahl

Zu verschiedenen Zeiten vor und nach Zugabe der Hemmstoffe zu den Kleinfermentern wurden Proben der Fermenterflüssigkeit entnommen und in eine Anaerobenkammer gebracht. Dort wurden mit vorreduzierter physiologischer Kochsalzlösung (pH 7,2) Verdünnungsreihen angesetzt. Geeignete Verdünnungen wurden ausplattiert; die beimpften Platten wurden in gasdichte Anaerobentöpfe (Balch et al., 1979) gepackt. Nach Austausch der Gasphase gegen 80% $N_2$ und 20% $CO_2$ mit einem Druck von 1,2bar wurden die Töpfe bei 37°C bebrütet. Nach 14 Tagen wurde die Anzahl der entstandenen Kolonien bestimmt.
Für diese Untersuchungen wurden vergleichend 4 verschiedene Medien benutzt:
MS-Agar (Hammes et al., 1979),
Clostridien-Agar nach Barnes und Ingram (1956),
VLS-Agar (Ueki et al., 1978)
Klärschlamm-Agar: 90% Auslauf aus den Kleinfermentern und 10% Frischschlamm vermischen, 30min bei 8000rpm zentrifugieren und Überstand abdekantieren.
Zu 100ml klarem Überstand zugeben:
1ml Vitaminlösung (Wolin et al., 1963),
1ml Spurenelementlösung (Wolin et al., 1963),
0,1ml $FeSO_4 \times 7\ H_2O$ 0,2%ig,
1,5g Agar.
pH auf 7,4 einstellen, vorreduzieren (wie MS-Medium, cf. Hammes et al., 1979) und 20min autoklavieren.

Es zeigte sich, daß auf VLS-Agar die meisten Kolonien heranwuchsen. Die auf diesem Medium bestimmten Werte sind angegeben.

d) Anzahl von methanogenen Keimen

Die Anzahl von methanogenen Keimen in der Fermenterflüssigkeit wurde durch mikroskopisches Auszählen in einer Zählkammer im Auflichtfluoreszenzmikroskop bestimmt. Da im Fluoreszenzlicht die Markierungen der Zählkammer nicht zu sehen sind, diente

als Meßeinheit ein Okularmikrometer mit quadratischer Einteilung (5x5mm). Bei einer Gesamtvergrößerung von 630fach entspricht die Fläche des Quadrates im Okularmikrometer genau der Fläche von 9 kleinen Quadraten in der Zählkammer, sodaß eine Berechnung des Titers nach folgender Formel möglich ist:

$$\frac{\text{Zellen pro Okularquadrat}}{9} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 2 \times 10^7 = \text{Zellen/ml}$$

Die Schlammproben wurden 1:10 mit vorreduzierter Saline (pH 7,2) verdünnt und möglichst rasch ausgezählt, um ein Verblassen der Fluoreszenz methanogener Zellen zu verhindern. Eine genaue Auszählung von „Klumpen methanogener Sarcinen ist nicht möglich. Die Zellklumpen wurden, abhängig von ihrer Größe, als 8 bis ca. 30 Einzelzellen gezählt.

Verwendete Geräte: Zeiss Forschungsmikroskop mit Auflichtfluoreszenzeinrichtung.
Neubauer Zählkammer Fläche 0,0025 $mm^2$
Tiefe 0,02 mm

II. 2. 5. Hemmstoffe

Die untersuchten Hemmstoffe, ihre Herkunft und die verwendeten Lösungsmittel sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Zusammenstellung der untersuchten Hemmstoffe

| Hemmstoff | Herkunft | Lösungsmittel |
|---|---|---|
| Arsanilsäure | Fa. Sigma, München | Wasser |
| Bacitracin | Fa. Sigma, München | Wasser |
| Furazolidon | Fa. Sigma, München | Äthanol |
| Spiramycin | Fa. Sigma, München | Äthanol |
| Sulfamethazin | Fa. Sigma, München | Äthanol |
| Tylosin | Fa. Sigma, München | Wasser |
| Monensin | Fa. Calbiochem, La Jolla, Kanada | Äthanol |
| Flavomycin | Gabe der Fa. Hoechst AG, Frankfurt | Wasser |
| Olaquindox | Gabe der Fa. Bayer AG, Leverkusen | DMSO |
| Lasalocid | Prof. Dr. W. Hammes, Universität Hohenheim | Äthanol |
| Virginiamycin | Prof. Dr. W. Hammes, Universität Hohenheim | Wasser |
| Dekaseptol | Gabe der Fa. Chem. Fabrik Marienfelde, Hamburg | - |
| Incidin 3 | Gabe der Fa. Henkel AG, Düsseldorf | - |
| Master Mix Environ | Gabe der Fa. Chem. Fabrik Wülfel, Hannover | - |
| Orbivet | Dipl. Biol. A. Steiner, Bayer. LA f. Wasserforschung, München | - |
| Thegodor 73 | Gabe der Fa. Th. Goldschmidt AG, Essen | - |

Mit den angegebenen Lösungsmitteln wurden Stammlösungen der Wirkstoffe hergestellt, vor Gebrauch wurden die Stammlösungen mit Wasser entsprechend verdünnt.

## II. 3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Standversuche sind in den Tabellen 5, 6 und 9 zusammengefaßt. Bei den Angaben in der Spalte "$C_{max}$ im Faulraum" handelt es sich um nur theoretisch erreichbare Höchstwerte, da bei der Berechnung angenommen wurde, daß die maximal erlaubte Menge des Wirkstoffes verfüttert wird und daß dieser vollständig und mit voller Aktivität über die Ausscheidungen der Tiere in die Gülle gelangt. Auch bei den Desinfektionsmitteln sind Höchstwerte angegeben, wobei angenommen wurde, daß eine Stallung an einem Tag vollständig desinfiziert wird und daß das gesamte verwendete Desinfektionsmittel in eine Tagesration Gülle gelangt. Die genaue Art und Weise der Berechnung der angegebenen Höchstkonzentrationen für die einzelnen Wirkstoffe ist im Anahng angegeben. In der letzten Spalte (Methanproduktion) sind die nach einer Einwirkzeit von 48h gemessenen Werte angegeben. Nach längeren Inkubationszeiten beobachtet man bei einigen Wirkstoffen eine Abnahme der Hemmwirkung bzw. eine Erholung der Methanproduktion. Da jedoch Biogasanlagen in der Praxis entweder kontinuierlich oder zumindest semikontinuierlich in relativ kurzen Intervallen beschickt werden, wird diese Erholung sich nicht auswirken können, da ständig eine Nachlieferung des Hemmstoffes erfolgt.
Im Folgenden werden die Wirkungen der Hemmstoffe, eingeteilt in drei Gruppen - Antibiotika, synthetische Chemotherapeutica und Desinfektionsmittel - genauer behandelt.

### II. 3. 1. Antibiotika

a) Hemmstoffe der bakteriellen Zellwandbiosynthese

Von den Fütterungsantibiotika, die auf die bakterielle Zellwandbiosynthese wirken, nämlich Flavomycin und Bacitracin, zeigt Flavomycin bei den Standversuchen auch in Konzentrationen, die weit über den in der Praxis möglichen liegen, keine Wirkung auf die Methangärung (Tab. 5).

Tab. 5: Wirkung von Fütterungsantibiotika auf die Methangärung im Standversuch

| Handelsname | Wirkstoff | $c_{max}$(theor.) im Faulraum (mg/l) | Geprüfte Konzentrationen (mg/l) | $CH_4$-Produktion nach 48 h (% von Kontrolle) |
|---|---|---|---|---|
| Zink-Bacitracin | Bacitracin | 29 | 100 | 68 |
| | | | 10 | 68 |
| | | | 3 | 80 |
| Flavophospholipol | Flavomycin | 11 | 50 | 104 |
| | | | 10 | 101 |
| | | | 3 | 100 |
| Avatec | Lasalocid | 6 | 100 | 25 |
| | | | 10 | 102 |
| | | | 3 | 105 |
| Rumensin | Monensin | 8 | 5 | 35 |
| | | | 2 | 35 |
| | | | 0,5 | 38 |
| Spiramix | Spiramycin | 29 | 50 | 44 |
| | | | 10 | 46 |
| | | | 2,5 | 46 |
| Tylan | Tylosin | 23 | 100 | 65 |
| | | | 10 | 67 |
| | | | 3 | 80 |
| Stafac | Virginiamycin | 29 | 50 | 46 |
| | | | 10 | 73 |
| | | | 3 | 81 |

Aufgrund seiner verbreiteten Anwendung in der Rindermast (unter dem Handelsnamen Flavophospholipol) wurde Flavomycin auch in den Kleinfermentern bei fortgesetzter Zugabe zum Gäransatz untersucht. Auch hier zeigten sich keinerlei Einflüsse auf die Gasproduktion und -zusammensetzung, auf den Gehalt an flüchtigen Säuren, auf die Koloniezahl und die Anzahl methanogener Keime.

Bacitracin hingegen hemmt in allen drei untersuchten Konzentrationen die Methanbildung. Es tritt keine völlige Hemmung ein, die Gasproduktion ist jedoch, abhängig von der eingesetzten

Hemmstoffkonzentration, mehr oder weniger verlangsamt. Auch nach längeren Inkubationszeiten wird die Methanausbeute der unbehandelten Kontrolle nicht erreicht (Abb. 5).

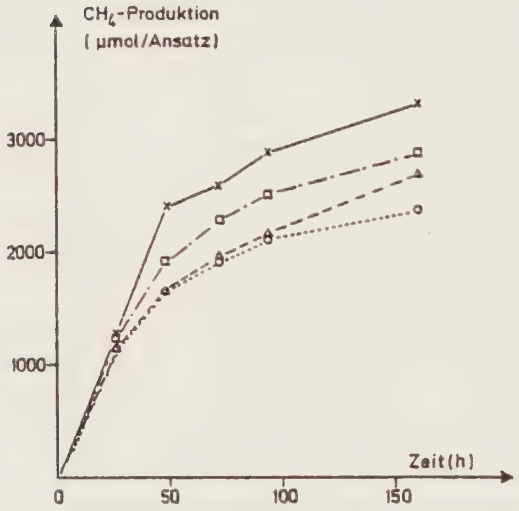


Abb. 5: Wirkung von Bacitracin auf die Methangärung im Standversuch

× Kontrolle
□ 3mg Bacitracin/l
△ 10mg Bacitracin/l
○ 100mg Bacitracin/l

b) Hemmstoffe der bakteriellen Proteinbiosynthese

In Standversuchen wurden auch die Antibiotika Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin untersucht, die auf die bakterielle Proteinbiosynthese durch Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen wirken. Alle drei Hemmstoffe beeinträchtigen die Methanbildung aus Klärschlamm auch in solchen Konzentrationen, wie sie zumindest theoretisch im Faulraum erreicht werden könnten, wobei Spiramycin die stärkste Hemmwirkung ausübt (Tab. 5). Ähnlich wie bei der Wirkung von Bacitracin wird auch hier die Methanbildung, selbst durch die höchsten eingesetzten Konzentrationen, nicht völlig unterbunden, sondern nur verlangsamt. Der Versuch wurde so lange fortgesetzt, bis in allen Ansätzen keine Zunahme der Gesamtmethanmenge mehr meßbar war. Es zeigte sich, daß die Methanausbeute, abhängig von der eingesetzten

Hemmstoffkonzentration, verringert ist, d.h. auch nach sehr langen Bebrütungszeiten wird in den mit Spiramycin behandelten Ansätzen die Methanmenge der unbehandelten Kontrolle nicht erreicht (Abb. 6).

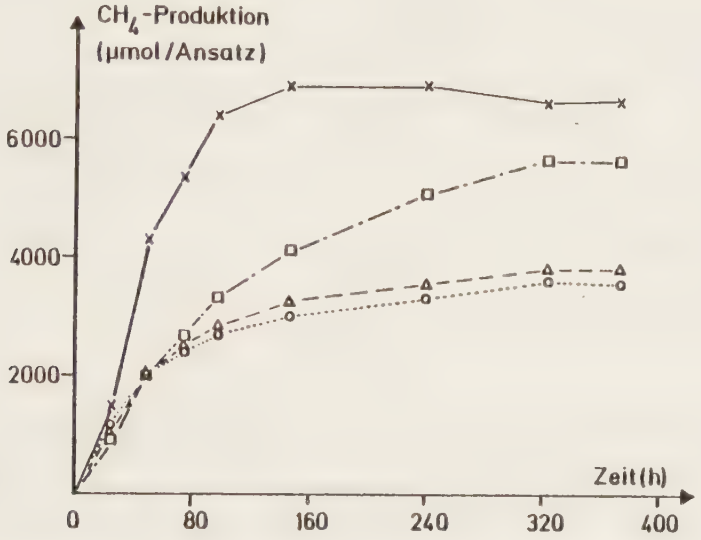


Abb. 6: Wirkung von Spiramycin auf die Methangärung im Standversuch
( x Kontrolle, □ 2,5mg Spiramycin/l, △ 10mg Spiramycin/l,
○ 50mg Spiramycin/l)

c) Ionophore Wirkstoffe

i. Wirkung von Monensin und Lasalocid im Standversuch

Eine sehr unterschiedliche Wirkung auf die Biogasproduktion zeigen die beiden ionophoren Wirkstoffe Monensin und Lasalocid (Tab. 5). Das als Fütterungsantibiotikum bei Rindern weit verbreitete Monensin beeinträchtigt auch in der sehr geringen Konzentration von 0,5mg/l die Methanproduktion aus Klärschlamm noch deutlich. Nach längeren Inkubationszeiten nimmt die Hemmwirkung dieser niedrigen Konzentration ab, und nach 20 Tagen ist hier nahezu ebensoviel Methan wie in der unbehandelten Kontrolle entstanden. Die Wirkung der höheren Konzentrationen (2 und 5mg/l) bleibt auch nach dieser langen Bebrütungszeit bestehen (Abb. 7).

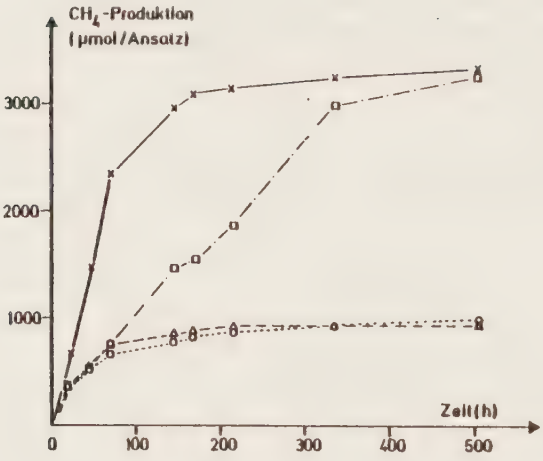


Abb. 7: Wirkung von Monensin auf die Methangärung im Standversuch

x Kontrolle
□ 0,5mg Monensin/l
△ 2mg Monensin/l
○ 5mg Monensin/l

Lasalocid wirkt nur in der sehr hohen und in der Praxis sicher nicht auftretenden Konzentration von 100mg/l hemmend. In geringeren Konzentrationen ruft der Hemmstoff, vor allem nach längerer Bebrütungszeit, eher eine Steigerung der Methanausbeute hervor (Abb. 8).

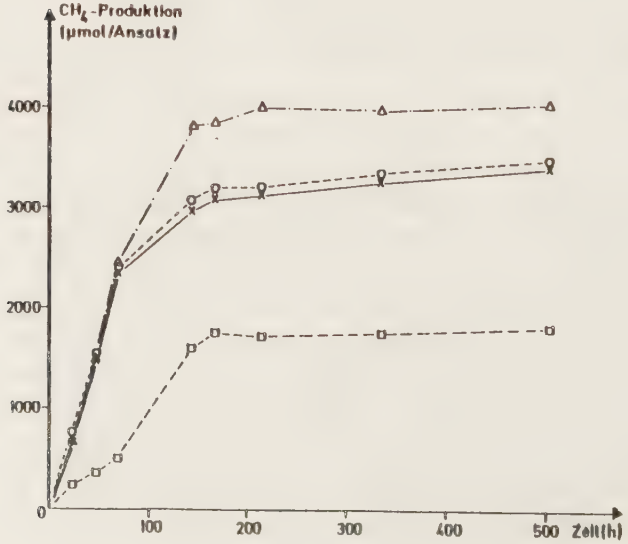


Abb. 8: Wirkung von Lasalocid auf die Methangärung im Standversuch

x Kontrolle
○ 3mg Lasalocid/l
△ 10mg Lasalocid/l
□ 100mg Lasalocid/l

Um weitere Hinweise auf die Wirkung beider Substanzen bei der Vergärung von komplexen organischen Substraten zu erhalten, wurden Monensin und Lasalocid in den semikontinuierlichen Kleinfermentern hinsichtlich ihrer Effekte auf Gasbildung und -zusammensetzung, auf den Gehalt an flüchtigen organischen Säuren, auf Koloniezahl und die Anzahl methanogener Keime näher untersucht. Beide Hemmstoffe wurden sowohl bei kontinuierlicher Zufuhr zur Fermentation als auch bei Stoßbelastung geprüft.

ii. Wirkungen von Monensin bei einmaliger Zugabe zu den Kleinfermentern

Bei einmaliger Zugabe von 1mg Monensin/l nimmt die Gasproduktion bereits innerhalb des ersten Tages um mehr als 50% ab (Abb. 9).

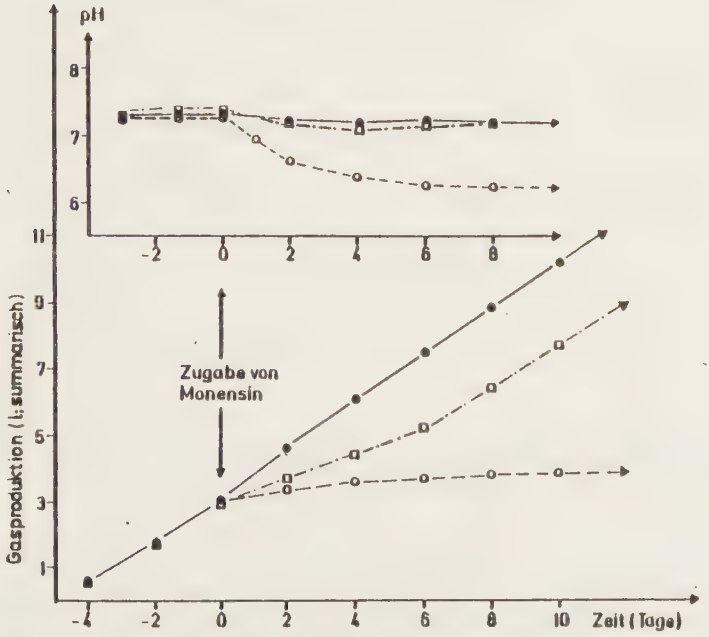


Abb. 9: Wirkung von Monensin auf Gasproduktion und pH-Wert bei einmaliger Zugabe zu den Kleinfermentern

( ● Kontrolle, □ 1mg Monensin/l, ○ 10mg Monensin/l)

Die tägliche Substratzufuhr, evtl. auch zusätzlich ein Abbau des Antibiotikums, führen zu einer Verringerung der Hemmstoffkonzentration im Fermenter, sodaß 6 Tage nach der Hemmstoffzugabe wieder eine normale Gasproduktion stattfindet (Abb. 9). Der Gehalt an Essig- und Propionsäure steigt deutlich an und bleibt auch über längere Zeit hinweg erhöht (Abb. 10). Die Zugabe von 3mg Monensin/l hat nahezu dieselben Effekte. Nach Zugabe von 10 und 50mg Monensin/l kommt dagegen die Gasbildung völlig zum Erliegen (Abb. 9). Der pH-Wert sinkt ab und der Gehalt an flüchtigen organischen Säuren, insbesondere Essigsäure, steigt stark an (Abb. 10).

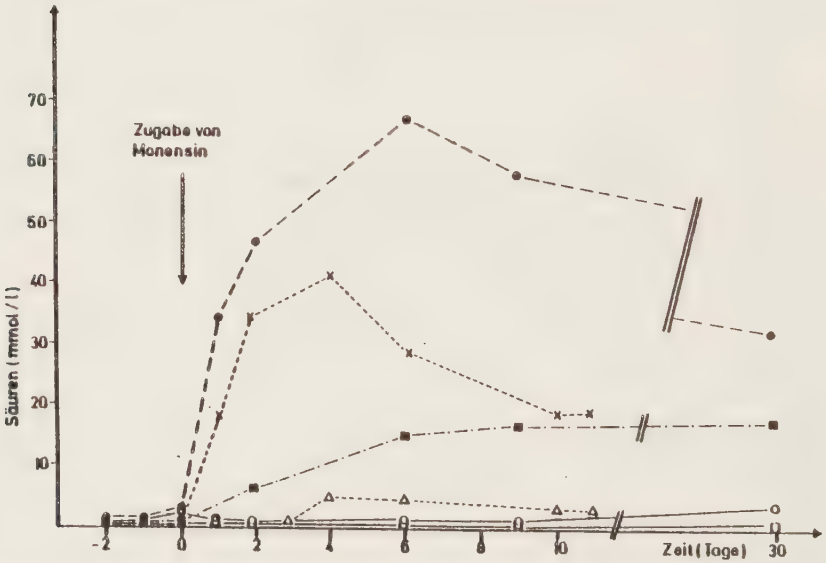


Abb 10: Wirkung von Monensin auf den Gehalt an Essig- und Propionsäure bei einmaliger Zugabe zu den Kleinfermentern
( O Essigsäure in der Kontrolle, x Essigsäure bei 1mg Monensin/l, ● Essigsäure bei 10mg Monensin/l, □ Propionsäure in der Kontrolle, △ Propionsäure bei 1mg Monensin/l, ■ Propionsäure bei 10mg Monensin/l)

Monensin bewirkt auch eine Abnahme der Anzahl methanogener Keime in der Fermenterflüssigkeit (Abb. 11). Der Effekt ist abhängig von der eingesetzten Hemmstoffkonzentration. Durch 10mg Monensin/l verringert sich die Methanogenenzahl innerhalb von 2 Tagen auf ca. ein Zehntel des Kontrollwertes und bleibt während des gesamten Versuchszeitraumes von 20 Tagen auf diesem niedrigen Niveau. 3mg Monensin/l verringern die Methanogenenzahl auf ca. ein Drittel des Kontrollwertes, 1mg/l hat nur noch geringen Einfluß. Bemerkenswert ist, daß zu Zeiten, während denen in den mit 1 bzw. 3mg Monensin/l behandelten Fermentern die Gasproduktion bereits wieder normal verläuft, die Methanogenenzahlen noch erniedrigt sind und sich erst langsam wieder erholen.

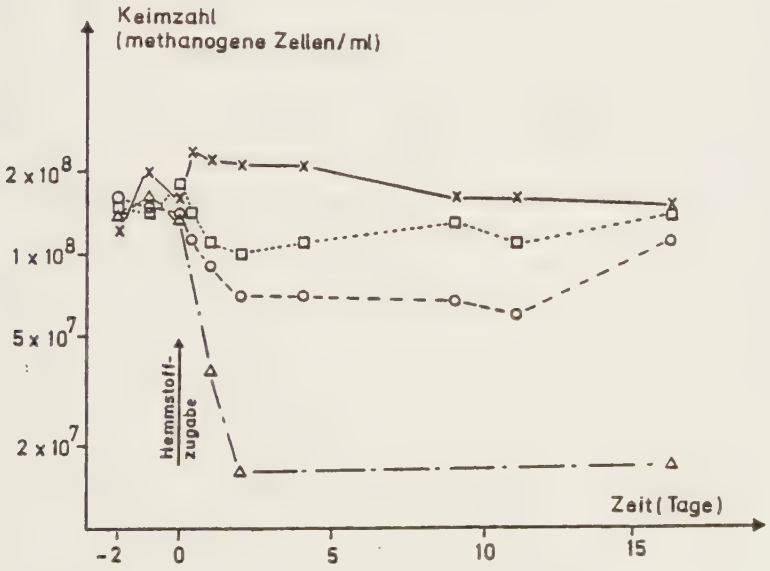


Abb. 11: Einfluß von Monensin auf die Anzahl methanogener Keime bei einmaliger Zugabe zu den Kleinfermentern
( x Kontrolle, □ 1mg Monensin/l, ○ 3mg Monensin/l,
△ 10mg Monensin/l)

Auf die Koloniezahl war kein rascher Einfluß aller getesteten Monensinkonzentrationen feststellbar. Auch 48h nach Zugabe der höchsten Konzentration von 50mg/l findet man noch $8,2 \times 10^7$ koloniebildende Einheiten/ml (Kontrolle $8,4 \times 10^7$). Bei Überprüfung der Koloniezahl 20 Tage nach Hemmstoffzugabe ergibt sich nur noch ein Wert von $7,7 \times 10^6$. Hierbei kann es sich jedoch auch um einen Effekt handeln, der nicht durch direkte Monensinwirkung bedingt ist.
Diejenigen Monensinkonzentrationen, die nicht zum Zusammenbruch der Gasproduktion führen (1 und 3mg/l), zeigen zu keinem Zeitpunkt einen Einfluß auf die Koloniezahl.

iii. Wirkungen von Monensin bei ständiger Zufuhr zu den Kleinfermentern

Bei fortlaufender täglicher Zugabe von Monensin in einer Konzentration von 1mg/l in der Substratration beobachtet man in den ersten 20 Tagen eine Zunahme der Hemmwirkung auf die Gasproduktion bis zu 20%. Dann läßt die Hemmung allmählich nach, und nach 40 Tagen wird wieder annähernd soviel Gas wie in der Kontrolle produziert (Abb. 12).
Der Gehalt an Essigsäure steigt innerhalb von 10 Tagen auf 20 bis 25mmol/l an (Kontrolle 1 bis 4mmol/l) und bleibt auch dann auf diesem Niveau, wenn bereits eine Erholung der Gasbildung stattfindet. Auf die Methanogenenzahl ist kein Einfluß feststellbar, man findet während der gesamten Versuchsdauer Werte zwischen 1 und $2 \times 10^8$ Methanogene/ml (Abb. 13).
Da sich bei der kontinuierlichen Zugabe des Hemmstoffes die Konzentration im Fermenter ständig erhöhen müßte (nach 30 Tagen sollten bereits mehr als 95% der Zugabekonzentration von 1mg/l erreicht sein; vgl. Tab. 6), hätte man eine stetige Zunahme der Hemmung der Gasproduktion auf mehr als 50% erwartet (vgl. einmalige Zugabe von 1mg Monensin/l). Die tatsächlich beobachtete Erholung der Gasproduktion spricht entweder für eine Inaktivierung des Hemmstoffes oder für eine Anpassung der Mikroflora an denselben.

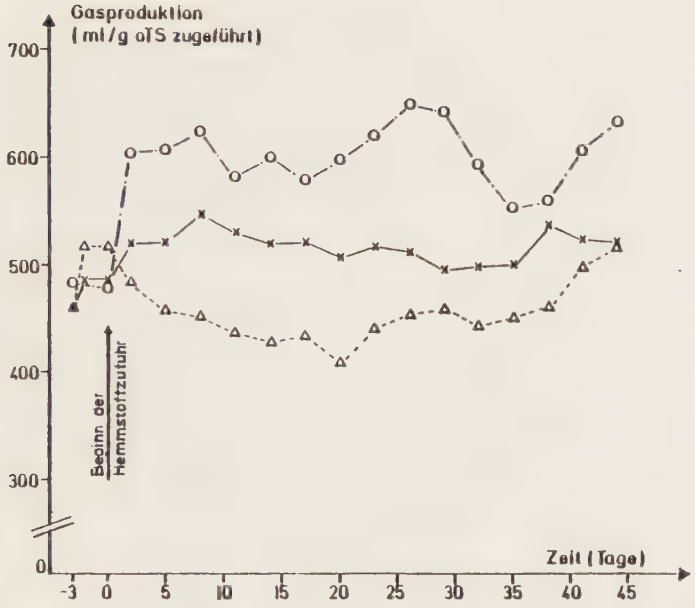


Abb. 12: Gasproduktionsraten bei ständiger Zufuhr von Monensin und Lasalocid zu den Kleinfermentern
( x Kontrolle, △ 1mg Monensin/l im Frischsubstrat,
O 50mg/l Lasalocid/l im Frischsubstrat)

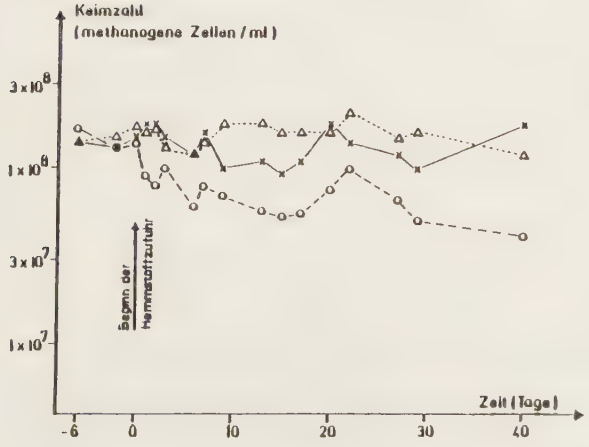


Abb. 13: Anzahl methanogener Keime in der Fermenterflüssigkeit bei ständiger Zufuhr von Monensin und Lasalocid zu den Kleinfermentern
(Symbole wie in Abb. 12)

iv. Anpassung von Fermentationen an Monensin

Da für die Vergärung von Rindergülle bereits eine Anpassung des Fermentationsprozesses an Monensin beschrieben worden war (Varel und Hashimoto, 1981 und 1982) und die Ergebnisse der Versuche mit ständiger Zugabe von Monensin zu den Kleinfermentern ebenfalls auf diese Möglichkeit hindeuteten, wurden auch hierzu Versuche durchgeführt. Schlamm aus den Fermentern, die 40 Tage lang kontinuierlich mit 1mg Monensin/l beschickt worden waren, wurde in Standversuchen neuerlich mit Monensin behandelt. Dieser Schlamm erwies sich als unempfindlicher gegen die neuerliche Hemmstoffzufuhr als nicht vorbehandelter Schlamm (Abb. 14). Allerdings lag die Methanbildungsrate in diesen Ansätzen von vorneherein niedriger als im unbehandelten Schlamm. (Zu diesem Problemkreis siehe auch III. 3. 2.:"Abbau von Monensin durch eine Reinkultur von Mbr. smithii PS").

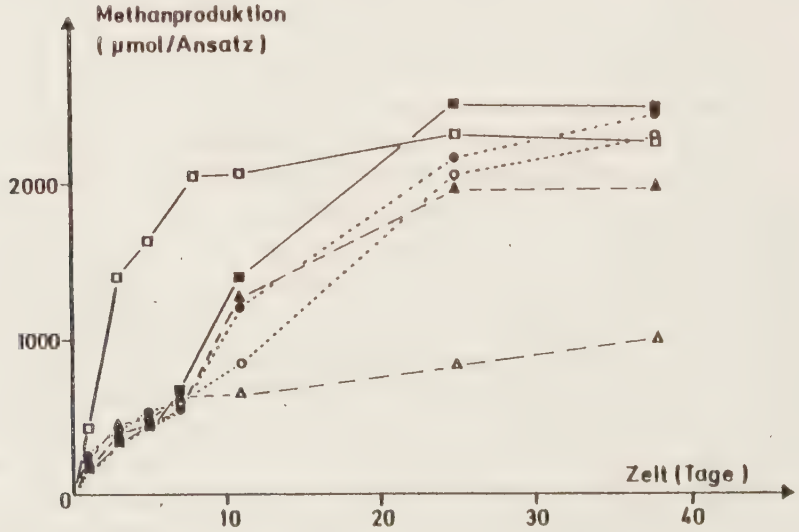


Abb. 14:Einfluß von Monensin auf die Methanproduktion bei Zugabe zu unbehandeltem und Monensin-vorbehandeltem Schlamm im Standversuch
(a. Schlamm ohne Vorbehandlung: □ Kontrolle, ○ 0,5mg Monensin/l
△ 1mg Monensin/l
b. Schlamm 40 Tage lang mit 1mg Monensin/l vorbehandelt:
■ Kontrolle, ● 0,5mg Monensin/l, ▲ 1mg Monensin/l)

v. Wirkungen von Monensin bei erhöhtem Natrium-Gehalt im Substrat

Die Zunahme des Essigsäuregehaltes und die Verringerung der Anzahl methanogener Keime nach Monensinzugabe deuten darauf hin, daß die methanogenen Bakterien durch Monensin direkt gehemmt werden. Demgegenüber führten Untersuchungen an der Pansenfermentation bzw. an Reinkulturen der daran beteiligten Mikroorganismen (Van Nevel und Demeyer, 1977; Chen und Wolin, 1979; Henderson et al., 1981) zu der Vorstellung, daß Monensin nur eine indirekte Wirkung auf die methanogene Flora durch Unterdrückung der Acetat- und Wasserstoffproduktion ausübt. Nachdem Thauer und Mitarbeiter (Perski et al., 1982) fanden, daß sich die Hemmwirkung von Monensin gegen methanogene Bakterien durch hohe Natriumkonzentrationen aufheben läßt, könnte der Unterschied zwischen den Befunden mit Klärschlamm und denen bei der Pansenfermentation durch Unterschiede im Na-Gehalt bedingt sein, denn im Klärschlamm liegen die Na-Konzentrationen bei nur 3-4mmol/l, in der Pansenflüssigkeit aber bei 90-100mmol/l (eigene Messung). Aus diesem Grund wurden Versuche mit erhöhtem Na-Gehalt im Klärschlamm durchgeführt. Durch Zugabe von NaCl wurde der Na-Gehalt in den Kleinfermentern innerhalb von 5 Tagen auf 100mmol/l angehoben. Diese Maßnahme hatte keinen Einfluß auf die Gasproduktion und den Gehalt an flüchtigen organischen Säuren. Nach weiteren zwei Tagen wurde Monensin bis zu einer Endkonzentration von 2mg/l zugegeben und weiterhin täglich mit Monensin-belastetem Substrat gefüttert (Konzentration im Frischsubstrat ebenfalls 2mg/l). Die Effekte auf die Gasproduktion und den Gehalt an Essigsäure sind in den Abb. 15 und 16 gezeigt. Man erkennt, daß Monensin in den Na-reichen Fermentern genau dieselben Wirkungen, also Verlangsamung der Gasproduktion bis hin zum Zusammenbruch und raschen Anstieg der Essigsäurekonzentration in der Fermenterflüssigkeit, hervorruft wie in den Fermentern mit niedriger Na-Konzentration. Der Na-Gehalt beeinflußt die Wirkungen von Monensin auf die Klärschlammvergärung in diesen Versuchen also nicht.

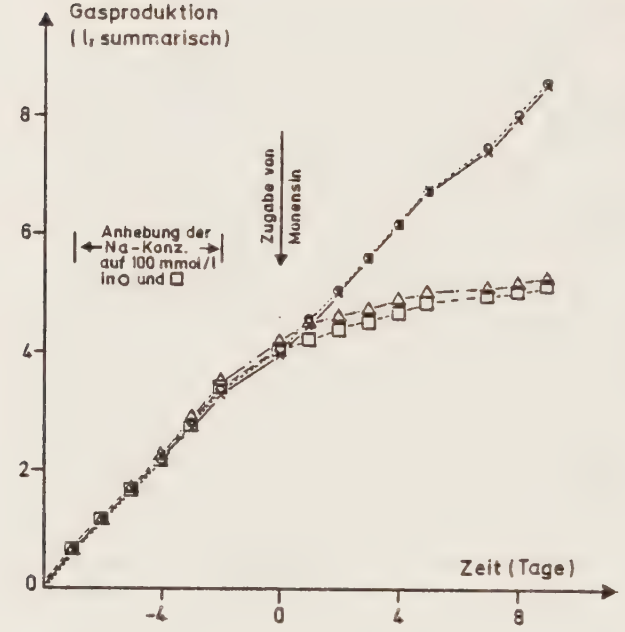


Abb. 15: Wirkung von Monensin auf die Gasproduktion bei der Vergärung von Klärschlamm mit unterschiedlichem Na-Gehalt
( x Kontrolle 4mmol Na/l
O Kontrolle 100mmol Na/l
△ 2mg Monensin/l bei 4mmol Na/l
□ 2mg Monensin/l bei 100mmol Na/l)

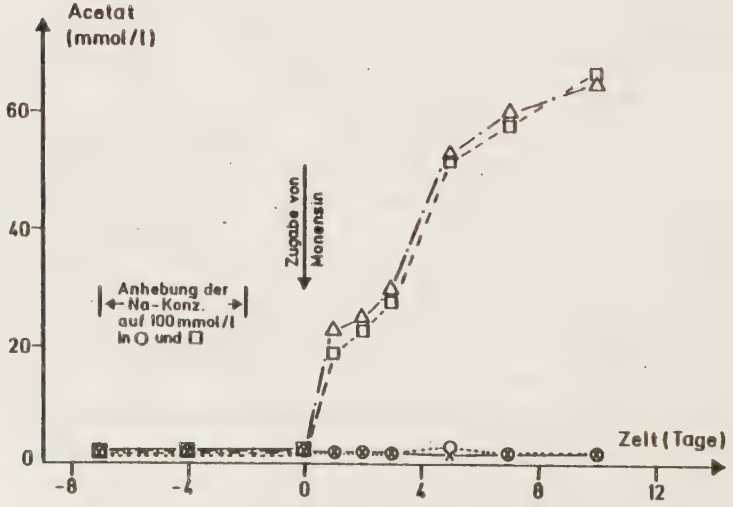


Abb. 16: Wirkung von Monensin auf den Essigsäuregehalt in der Fermentationsflüssigkeit bei der Vergärung von Klärschlamm mit unterschiedlichem Na-Gehalt (Symbole wie in Abb. 15)

vi. Wirkungen von Lasalocid bei einmaliger und bei ständiger Zufuhr zu den Kleinfermentern

Lasalocid führt bei einmaliger Zugabe von 3 bzw. 10mg/l zu den Kleinfermentern am ersten Tag nach Zugabe zu einer um ca. 20% erhöhten Gasproduktion, an den darauffolgenden Tagen ist die Gasproduktion wieder normal (Abb. 17). Die Konzentration der flüchtigen organischen Säuren, die Gaszusammensetzung, der pH-Wert, die Koloniezahl und die Anzahl methanogener Keime ändern sich nicht.

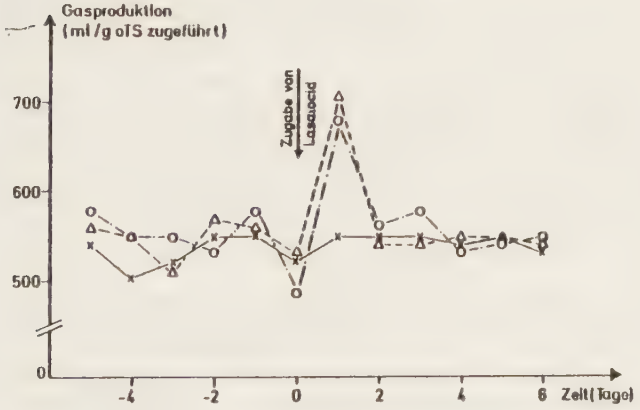


Abb. 17: Einfluß von Lasalocid auf die Gasproduktion bei einmaliger Zugabe zu den Kleinfermentern
( x Kontrolle
O 3mg Lasalocid/l
Δ 10mg Lasalocid/l)

Bei kontinuierlicher Zufuhr von Lasalocid (50mg/l in der täglichen Substratration) erhöht sich die Gasausbeute in den ersten beiden Tagen um ca. 20% und stellt sich dann auf ein Niveau von 10-15% über dem Kontrollwert ein (Abb. 12). Der Methangehalt des gebildeten Biogases bleibt während des gesamten Versuchszeitraumes von 40 Tagen konstant bei 72-76%, die Konzentrationen von Essig- und Propionsäure in der Fermenterflüssigkeit bleiben praktisch unbeeinflußt. Trotz der erhöhten Gasproduktion und des gleichbleibenden Methangehaltes des gebildeten Gases ist die Anzahl methanogener Keime leicht verringert (Abb. 13). Dieser Befund deutet auf eine erhöhte Methanbildung durch die methano-

genen Mikroorganismen hin. Hierzu wurden weitere Versuche mit Reinkulturen methanogener Bakterien durchgeführt, die in Teil III. besprochen werden. Auch bei kontinuierlicher Zufuhr zur Fermentation zeigte Lasalocid keinen Einfluß auf die Koloniezahl.

### II. 3. 2. Synthetische Chemotherapeutica

Vier Vertreter von synthetischen Chemotherapeutica wurden in Standversuchen untersucht (Tab. 6). Sulfamethazin zeigt in den untersuchten Konzentrationen keinen Einfluß auf die Methanbildung, Furazolidon hemmt nur in der im Faulraum auch theoretisch nicht mehr erreichbaren Konzentration von 200mg/l. Arsanilsäure und Olaquindox wirken in Konzentrationen von 100 bzw. 1mg/l, die in der Praxis bei vorschriftsmäßigem Gebrauch beider Mittel theoretisch noch erreicht werden können (siehe Anhang), stark hemmend auf die Methanbildung.

Tab. 6: Wirkung von synthetischen Chemotherapeutica auf die Methangärung im Standversuch

| Handelsname | Wirkstoff | $c_{max}$(theor.) im Faulraum (mg/l) | Geprüfte Konzentrationen (mg/l) | $CH_4$-Produktion nach 48 h (% von Kontrolle) |
|---|---|---|---|---|
| | Arsanilsäure | 144* | 100 | 54 |
| Animedica S-2 (Ars.+Fur.) | | | 10 | 88 |
| | | | 3 | 90 |
| | Furazolidon | 144* | 200 | 41 |
| | | | 50 | 93 |
| Animedica S-3 (Ars.+Fur.+ Sulf.) | | | 3 | 97 |
| | Sulfamethazin | 144 | 100 | 101 |
| | | | 20 | 99 |
| | | | 3 | 102 |
| Bayo-N-ox | Olaquindox | 58 | 100 | 4 |
| | | | 10 | 32 |
| | | | 1 | 35 |

* = bei Kombination von Animedica S-2 und S-3 können die Werte noch um 80 % höher liegen

Die Untersuchung von Arsanilsäure, Sulfamethazin und Furazolidon ist von besonderem Interesse, da bereits ein Störfall in einer Biogasanlage beobachtet wurde, nachdem Präparate mit diesen Inhaltsstoffen angewendet wurden. Im Januar 1981 trat in der Schweinemästerei Wallner in Gilching/Obb. eine Ferkelgrippe auf, die mit dem Medikament Animedica S-2 (Tab. 7) behandelt wurde. Zusätzlich erhalten dort neu hinzugekaufte Ferkel routinemäßig 14 Tage lang das Präparat Animedica S-3 (Tab. 7).

Tab. 7: Zusammensetzung der Präparate Animedica S-2 und S-3

| Präparat | Wirkstoffgehalt je kg | Dosierung zur Prophylaxe (Endkonz. im Futter) | Dosierung zur Therapie (Endkonz. im Futter) |
|---|---|---|---|
| S-2 | 50g Furazolidon<br>50g Arsanilsäure | 0,25% | 0,5% |
| S-3 | 50g Sulfamethazin<br>40g Furazolidon<br>40g Arsanilsäure | 0,15-0,25% | 0,25-0,5% |

Der Verlauf der Biogasproduktion während der Ferkelgrippe ist in Abb. 18 wiedergegeben. Es liegt nahe, den Einbruch in der

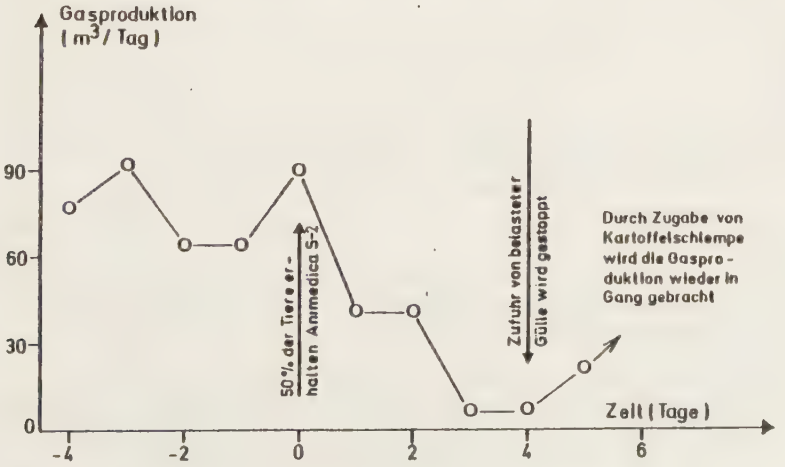


Abb. 18: Verlauf der Gasproduktion in der Biogasanlage Wallner während der Behandlung einer Ferkelgrippe mit dem Medikament Animedica S-2

Gasbildung auf die Anwendung der Medikamente zurückzuführen. Da sich in den Standversuchen Furazolidon und Sulfamethazin als unschädlich für die Biogasproduktion erwiesen, dürfte die Hemmwirkung durch den Gehalt an Arsanilsäure hervorgerufen worden sein. Aus diesem Grund wurde Arsanilsäure auch bei täglicher Zugabe des Wirkstoffes zu den semikontinuierlichen Fermentern untersucht (100mg/l in der Tagesration). Hier beeinflußt der Wirkstoff 4 Tage lang die Gasproduktion überhaupt nicht, dann bewirkt er eine langsame Abnahme der Gasproduktion auf weniger als die Hälfte des Kontrollwertes. Die Methanbildung kommt jedoch auch nach 20-tägiger Hemmstoffzugabe nicht völlig zum Erliegen (Abb. 19).

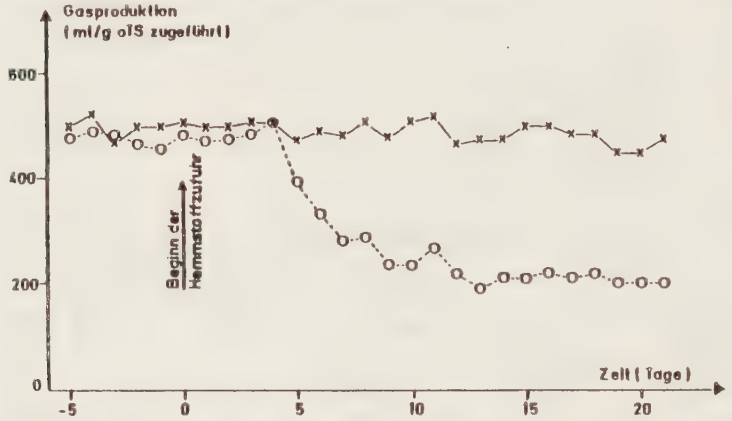


Abb. 19: Wirkung von Arsanilsäure auf die Gasproduktion bei ständiger Zufuhr zu den Kleinfermentern
(x Kontrolle, O 100mg Arsanilsäure/l im Frischsubstrat)

Essigsäure und Propionsäure steigen deutlich an und pendeln sich auf erhöhtem Niveau ein (Abb. 20). Der Anstieg des Gehaltes an flüchtigen Säuren beschleunigt sich ebenfalls nach wenigen Tagen. Dies und die "lag-Phase" bei der Hemmung der Gasproduktion deuten darauf hin, daß erst ein bestimmter Schwellenwert erreicht werden muß, bevor die Hemmwirkung von Arsanilsäure auf die Biogasproduktion auftritt. In unserem Fall wird erstmals nach der vierten Zufuhr von hemmstoffhaltigem Substrat eine Wirkung beobachtet (Abb. 19). Unter der

Annahme, daß der Hemmstoff in den Fermentern nicht abgebaut wird, sind zu diesem Zeitpunkt ca. 34% der Zugabekonzentration, hier also ca. 34mg/l erreicht (vgl. Tab. 8).

Tab. 8: Zunahme der Hemmstoffkonzentration im Fermenter bei semikontinuierlicher Zufuhr von hemmstoffbelastetem Frischsubstrat*
(a: Tage seit Beginn der Hemmstoffzufuhr; b: Endkonzentration im Fermenter in % der Konzentration im Frischsubstrat)

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| b | 10,0 | 19,0 | 27,1 | 34,3 | 41,0 | 46,9 | 52,2 | 57,0 | 61,3 | 65,1 | 68,6 |
| a | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 |
| b | 71,8 | 74,6 | 77,1 | 79,4 | 81,5 | 83,3 | 85,0 | 86,5 | 87,8 | 89,1 | 90,2 |

* Die Tabelle gilt für eine Retentionszeit von 10 Tagen und unter der Voraussetzung, daß die Hemmstoffkonzentration im Frischsubstrat gleich bleibt und kein Abbau des Wirkstoffes im Fermenter stattfindet.

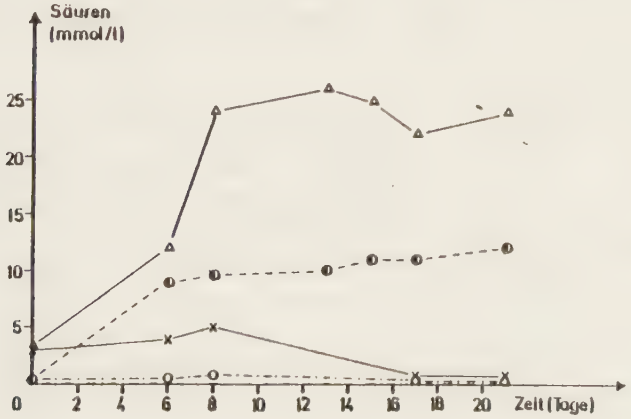


Abb. 20: Wirkung von Arsanilsäure auf den Gehalt an Essig- und Propionsäure bei ständiger Zufuhr zu den Kleinfermentern
(x Essigsäure in der Kontrolle, Δ Essigsäure bei 100mg Arsanilsäure/l, O Propionsäure in der Kontrolle, ◐ Propionsäure bei 100mg Arsanilsäure/l)

## II. 3. 3. Desinfektionsmittel

Von den zahlreichen handelsüblichen Stalldesinfektionsmitteln wurden fünf Präparate verschiedener chemischer Zusammensetzung untersucht (Tab.9). Zwei Mittel enthalten Aldehyde und Alkohole (INDICIN 3 und ORBIVET), je ein Mittel enthält Phenole (MASTER MIX ENVIRON), eine Mischung von Aldehyden und quaternären Ammoniumverbindungen (THEGODOR 73) oder eine Mischung aus Schwefelkohlenstoff, Phenolen und Chloroform (DEKASEPTOL). Alle Mittel sind in die Liste der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) für geprüfte Stalldesinfektionsmittel aufgenommen.Speziell DEKASEPTOL ist auch zur Bekämpfung von Coccidien-Oocysten und Wurmeiern geeignet. Dieses Mittel wirkt als einziges auch in geringer Konzentration stark hemmend auf die Gasbildung. Nur in hohen Konzentrationen, die in der Praxis höchstens in Extremfällen auftreten können, hemmen auch INDICIN 3, THEGODOR 73 und ORBIVET. Das phenolhaltige MASTER MIX ENVIRON war in den getesteten Konzentrationen nahezu unwirksam auf die Methangärung.

Tab. 9: Wirkung von Stalldesinfektionsmitteln auf die Methangärung im Standversuch

| Handelsname | Wirkstoff | $c_{max}$(theor.) im Faulraum (mg/l) | Geprüfte Konzentrationen (mg/l) | $CH_4$-Produktion nach 48 h (% von Kontrolle) |
|---|---|---|---|---|
| Dekaseptol | Chloroform | 120 | 300 | 11 |
| | $CS_2$ | | 30 | 10 |
| | Phenole | | | |
| Incidin 3 | Aldehyde | 30 | 160 | 14 |
| | Alkohole | | 16 | 83 |
| Master Mix | Phenole | 20 | 100 | 94 |
| Environ | | | 10 | 92 |
| Orbivet | Aldehyde | 30 | 500 | 27 |
| | Alkohole | | 100 | 60 |
| | | | 10 | 87 |
| Thegodor 73 | Aldehyde | 30 | 500 | 37 |
| | Quaternäre | | 100 | 63 |
| | Ammoniumverb. | | 10 | 87 |

## II. 4. Diskussion

### II. 4. 1. Beurteilung der Standversuche als Testverfahren für die Praxis

Die hier in den Standversuchen durchgeführte Überprüfung der Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die Methangärung unterscheidet sich in einigen Punkten von dem von Schefer (1981) vorgeschlagenen Verfahren. Dort wird ein Konzentrat aus Belebtschlamm mit einer Nährsalzlösung auf einen definierten Gehalt an TS verdünnt, mit 0,2% (v/v) Faulwasser aus dem Faulturm einer Kläranlage angeimpft und bei 30°C in 500ml-Schliffflaschen inkubiert, die mit einem Verdrängungsgasometer verbunden sind. Die gebildete Gasmenge wird während mehrerer Wochen protokolliert. Der Hauptunterschied zum hier angewendeten Verfahren liegt darin, daß sich in den Schliffflaschen erst eine Biogas-produzierende Mikroflora durchsetzen muß, während sie bei unserem Versuchsansatz bereits vorhanden ist und auch kurze Zeit nach Ansetzen der Proben voll aktiv ist. Dies geht aus einem Vergleich der Gasproduktionsraten bei unseren Versuchen (z.B. Abb. 6: Volle Gasproduktion nach 24h; Hauptmenge bereits nach 5 Tagen gebildet) und denen von Schefer hervor. Dort dauert es zwei Wochen, bis die Gasbildung in Gang kommt, die Hauptmenge ist nach ca. 5 Wochen gebildet.
Abgesehen von der Zeitersparnis scheint unser Verfahren auch eher den tatsächlichen Verhältnissen in einem Faulturm oder einer Biogasanlage zu entsprechen, da ja auch dort die Biogasbildende Mikroflora bereits vorhanden und aktiv ist, wenn ein Hemmstoff in den Faulraum gelangt. Im Falle des von Schefer vorgeschlagenen Verfahrens muß sich die entsprechende Mikroflora erst durchsetzen, und zwar bei Anwesenheit des zu untersuchenden Hemmstoffes, was von vorneherein zur Selektion einer speziellen, unempfindlichen Population führen kann.
Ein weiterer Vorteil unseres Verfahrens besteht darin, daß die gebildete Methanmenge, nicht die gebildete Gasmenge gemessen wird. Es ist durchaus denkbar, daß durch die Wirkung eines Hemm-

stoffes das Verhältnis von $CH_4$ zu $CO_2$ im Biogas zugunsten von $CO_2$ verschoben wird. Eine derartige Veränderung ist mit einfacher Volumenmessung nicht feststellbar. Da jedoch in der Praxis gerade der Brennwert und damit der Methangehalt des Biogases von Interesse ist, sollte diese Möglichkeit bei der Überprüfung von Hemmstoffen beachtet werden.
Diesen Vorteilen steht ein größerer apparativer Aufwand (Gaschromatograph, Betreiben eines Laborfermenters zur Bereitstellung von aktivem Schlamm) gegenüber. Da jedoch Hemmstoffuntersuchungen meist von vorneherein in eingerichteten Laboratorien und nicht in der Kläranlage oder auf dem landwirtschaftlichen Anwesen durchgeführt werden, sollten diese Nachteile weniger ins Gewicht fallen.

### II. 4. 2. Wirkungen von Hemmstoffen der bakteriellen Zellwandbiosynthese

Von den in der Tierfütterung eingesetzten Hemmstoffen der bakteriellen Zellwandbiosynthese, nämlich Bacitracin und Flavomycin, wirkt nur Bacitracin hemmend auf die Methangärung. Dies stimmt mit der unterschiedlichen Wirksamkeit beider Hemmstoffe gegen Reinkulturen methanogener Bakterien überein. Während nämlich Flavomycin mit einer Ausnahme unwirksam gegen alle untersuchten Methanbakterien ist, hemmt Bacitracin die Mitglieder der Gattungen Methanobacterium, Methanobrevibacter und Methanococcus, nur Methanosarcina und Methanospirillum sind unempfindlich (Hilpert et al., 1981; vgl. auch Teil III., Tab. 10).
Ein weiterer interessanter Befund ist die Tatsache, daß auch durch höhere Konzentrationen von Bacitracin die Methangärung nur zu ca. 30% gehemmt wird. Es ist bekannt, daß bei der Vergärung von komplexen organischen Substraten im mesophilen Bereich ca. 70-75% des gebildeten Methans aus der Methylgruppe der Essigsäure stammen (Mackie und Bryant, 1981). Von den bisher beschriebenen Methanbakterien sind jedoch nur die Vertreter der Gattung Methanosarcina (Balch et al., 1979) und Methanothrix soehngenii (Huser et al., 1982) in der Lage, Methan direkt durch Decarboxylierung aus Essigsäure zu bilden. Da nun, wie schon erwähnt,

Methanosarcina unempfindlich gegen Bacitracin ist, läßt sich die nur 30%ige Hemmung durch diesen Wirkstoff gut erklären. Sie kann weiterhin auch als Hinweis dafür angesehen werden, daß zumindest durch die hier untersuchten Konzentrationen von Bacitracin die fermentativen Mikroorganismen nur unwesentlich oder überhaupt nicht betroffen werden.
Von Phosphoglycolipidantibiotika, zu denen Flavomycin gehört, ist bekannt, daß ihr Wirkungsspektrum hauptsächlich grampositive Keime umfaßt, da sie vermutlich durch gramnegative Zellhüllen nicht bis zu ihrem Wirkort vordringen können (Huber, 1979). Bacitracin hingegen hemmt auch gramnegative Keime. Die Wirkungslosigkeit von Flavomycin auf die Methangärung könnte also ein Hinweis dafür sein, das grampositive Keime für den Gesamtprozess nicht essentiell sind. Bei der Gramfärbung von 12 zufallsmäßig ausgewählten fermentativen Isolaten aus den Kleinfermentern erwiesen sich jedoch nur drei als gramnegativ, die anderen neun zeigten grampositive Reaktion. Weiterhin waren von den drei gramnegativen Isolaten zwei mäßig empfindlich gegen Flavomycin, während zwei der grampositiven Isolate völlig unempfindlich waren. Es ist also nicht angezeigt, aus der Unwirksamkeit von Flavomycin auf die Methangärung Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der daran beteiligten Mikroflora zu ziehen. Ebensogut ist es möglich, daß der Wirkstoff im Fermenter rasch inaktiviert wird.

### II. 4. 3. Wirkungen von Hemmstoffen der bakteriellen Proteinbiosynthese

Die drei untersuchten Fütterungsantibiotika, die gegen die bakterielle Proteinbiosynthese wirken, nämlich Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin, hemmen die Methangärung auch in relativ geringen Konzentrationen. Der Effekt von Spiramycin ist am stärksten ausgeprägt.
Von den Macrolidantibiotika, zu denen die drei Hemmstoffe gehören, ist bekannt, daß ihr Wirkungsspektrum, ähnlich wie bei den Phosphoglycolipidantibiotika, hauptsächlich grampositive Keime umfaßt (Drews, 1979). Allerdings liegen die minimalen Hemmkon-

zentrationen dieser Wirkstoffe gegen einige gramnegative Keime deutlich unter denen von Flavomycin (Vazquez, 1975; Hoechst AG, 1980). Im Plattendiffusionstest erwies sich Spiramycin als nur schwach wirksam gegen die drei gramnegativen, fermentativen Isolate aus den Kleinfermentern. Dies und die Tatsache, daß die Methangärung auch durch solche Konzentrationen der Macrolidantibiotika noch gehemmt wird, die gegen Reinkulturen von bisher untersuchten gramnegativen Keimen keine Wirkung mehr zeigten (Vazquez, 1975), spricht dafür, daß grampositive Keime durchaus für den Gesamtprozess der Methangärung essentiell sind.

II. 4. 4. Wirkungen von Ionophoren

a) Vergleich Monensin und Lasalocid

Die unterschiedliche Wirkung von Monensin und Lasalocid ist überraschend. Da beide Wirkstoffe Reinkulturen methanogener Bakterien im Plattendiffusionstest stark hemmen (Hilpert et al., 1981) und auch zur selben Gruppe von Hemmstoffen gehören, hätte man zumindest ähnliche Wirkungen auf die Methangärung erwartet. Jedoch stimmt die hier beobachtete unterschiedliche Wirkung von Monensin und Lasalocid mit Ergebnissen von Varel und Hashimoto (1982) überein, die fanden, daß Lasalocid bei der Vergärung von Rindergülle ebenfalls keine Hemmwirkung ausübt, während Monensin diesen Prozess deutlich hemmt.
Die erhöhte Methanproduktion unter dem Einfluß bestimmter Konzentrationen von Lasalocid bei gleichzeitiger geringer Abnahme der Anzahl methanogener Keime wird erklärbar, wenn man annimmt, daß der Wirkstoff eine entkoppelnde Wirkung auf Methanbakterien ausübt, d.h. Wachstum bzw. Energiegewinn der Organismen verhindert, während die energieliefernden Stoffwechselreaktionen, hier also die Methanbildung (cf. Thauer et al., 1977), weiterlaufen. Versuche mit Reinkulturen methanogener Bakterien zeigen, daß durch Lasalocid ein derartiger Effekt hervorgerufen werden kann (siehe Teil III.).
Ein wesentlicher Unterschied zur Wirkung von Monensin ist weiterhin, daß durch diesen Hemmstoff die Gehalte an Essig- und Propi-

onsäure im Fermenter deutlich erhöht werden, während sie durch Lasalocid bei gleicher Konzentration unbeeinflußt bleiben. Die Wirkung von Lasalocid scheint also unter den hier herrschenden Bedingungen auf die methanogene Mikroflora beschränkt zu sein.

Da auch bei den Mikroorganismen, die an der Essig- und Propionsäurebildung beteiligt sind, eine Energiekonservierung (= ATP-Bildung) mit Hilfe von Koppelungsmechanismen an Membranen stattfindet (z.B. gekoppelt an den Elektronentransport bei der Reduktion von Fumarat zu Succinat (Thauer et al., 1977) und über Na-Ionengradienten vermutlich auch gekoppelt an Decarboxylierungsreaktionen (Dimroth, 1980; W. Hilpert und Dimroth, 1982; Buckel und Semmler, 1982)), kann der Anstieg dieser Säuren unter dem Einfluß von Monensin ebenfalls als Folge einer Entkopplung angesehen werden, wobei hier nun die Essig- und Propionsäure-bildenden Mikroorganismen betroffen sind.
Für eine derartige Entkopplung spricht auch die unter Monensineinwirkung beobachtete verringerte Wachstumsleistung der Mikroorganismen bei erhöhtem Propionsäuregehalt bei in vitro-Pansenfermentationen (Van Nevel und Demeyer, 1977; Stanier und Davies, 1981). Henderson et al. (1981) fanden bei Untersuchungen an Reinkulturen von Pansenorganismen bei Einsatz von Monensin eine Erhöhung der Acetatbildung durch Ruminococcus albus, was ebenfalls als Folge einer entkoppelnden Wirkung des Hemmstoffes angesehen werden kann.

b) Vergleich der Wirkungen von Monensin im Pansen und bei der Klärschlammfermentation

Monensin bewirkt bei der Vergärung von Klärschlamm einen deutlichen Anstieg von Essig- und Propionsäure, während es bei der Pansenfermentation das Verhältnis beider Säuren zugunsten von Propionsäure verschiebt (Van Nevel und Demeyer, 1977; Stanier und Davies, 1981). Weiterhin wird in der Arbeit von Van Nevel und Demeyer (1977) mit Pansenflüssigkeit und auch in Versuchen mit Reinkulturen von Pansenbakterien (Chen und Wolin, 1979; Henderson et al., 1981) keine direkte Hemmung der Methanbakterien beschrieben, während bei der Vergärung von Klärschlamm bei Anwen-

dung von Monensin die Anzahl methanogener Keime deutlich abnimmt. Auch das Wachstum von Reinkulturen methanogener Baterien wird durch Monensin gehemmt (siehe Teil III.). Beim Vergleich der zitierten mit den hier vorliegenden Ergebnissen ist jedoch zu beachten, daß dort jeweils indirekte Meßmethoden zur Prüfung der Hemmwirkung von Monensin gegen Methanogene angewandt wurden (Messung der $CH_4$-Produktion oder Abnahme von Substratwasserstoff), während in der vorliegenden Arbeit die Anzahl methanogener Keime direkt mikroskopisch bestimmt wurde. Da Monensin, wie in Teil III. gezeigt wird, gegen methanogene Bakterien zumindest formal eine entkoppelnde Wirkung ausübt, ist eine Hemmung des Substratumsatzes gerade nicht zu erwarten, wohingegen Wachstum und Zellzahl durchaus betroffen sein können. Eine direkte Hemmung der methanogenen Mikroflora durch Monensin ist also auch bei der Pansenfermentation, ebenso wie bei der Vergärung von Klärschlamm, nicht auszuschließen.
Allerdings sind natürlich sehr wohl Verschiedenheiten zwischen der Pansenfermentation und der Vergärung von Klärschlamm in Biogasanlagen vorhanden. Ein signifikanter Unterschied ist der Gehalt an Natrium (Pansen ca. 100mmol/l; Klärschlamm 3-4mmol/l). Es wäre denkbar, daß dieser Faktor unterschiedliche Empfindlichkeit der methanogenen Flora gegen Monensin bedingt, nachdem bereits beobachtet wurde, daß die Wirkung von Monensin auf Reinkulturen methanogener Bakterien durch den Na-Gehalt im Medium beeinflußbar ist (Perski et al., 1982). Durch Anhebung der Na-Konzentration auf 100mmol/l konnte jedoch keine Aufhebung oder Veränderung der Wirkung von Monensin auf die Klärschlammfermentation herbeigeführt werden. Dies zeigt, daß die beobachteten Unterschiede in der Monensinwirkung auf die beiden Gärprozesse auf anderen Eigenschaften des Substrates bzw. der Mikroflora beruhen müssen.

c) Möglichkeiten der Anpassung von Fermentationsprozessen an Monensin

Monensin muß nicht unbedingt einen völligen Zusammenbruch der Fermentation bedingen. Bei laufender Zufuhr von geringen Mengen

des Hemmstoffes stellt sich ein Zustand ein, in dem der Kontrolle vergleichbare Methanmengen produziert werden, wobei jedoch die Essig- und Propionsäurepegel erhöht sind. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Varel und Hashimoto (1982) an Rindergülle gewonnenen Erkenntnissen überein. Auch im Standversuch erweist sich ein bereits an Monensin adaptierter Schlamm als unempfindlicher gegen den Hemmstoff als ein nicht vorbehandelter Schlamm. Dies spricht dafür, daß bei der Anpassung an Monensin die Selektion einer weniger empfindlichen Mikroflora eine Rolle spielen kann.
Allerdings ist auch eine Inaktivierung des Hemmstoffes möglich, wie Versuche mit einer Reinkultur von Mbr. smithii PS zeigten (siehe Teil III.). Auch die Beobachtung von Varel und Hashimoto (1981), daß im Standversuch mit Monensin-belasteter Rindergülle die Gasproduktion 40 Tage lang völlig unterdrückt ist, dann jedoch einsetzt und nach 180 Tagen zu einer der Kontrolle vergleichbaren Gasausbeute führt, kann durch eine Inaktivierung von Monensin erklärt werden.
Vermutlich sind bei der Anpassung von Fermentationen an Monensin in der Praxis beide Prozesse, also Selektion einer resistenten Mikroflora und Inaktivierung des Hemmstoffes, von Bedeutung.

d) Entkopplerwirkung als Grundlage für die Effekte von Monensin und Lasalocid auf Fermentationsprozesse

Die Wirkungen von Lasalocid und Monensin auf die Klärschlammvergärung lassen sich zusammenfassend folgendermaßen interpretieren:
Lasalocid wirkt in geeigneter Konzentration vermutlich vornehmlich auf die methanogene Mikroflora. Hier entkoppelt es, zumindest teilweise, Methanproduktion und Zellwachstum. Da keine zusätzliche Belastung der Fermentation durch erhöhte Säuregehalte auftritt, kann ein Zustand erreicht werden, in dem trotz verringerter Anzahl methanogener Keime mehr Methan pro zugeführter Substratmenge produziert wird.

Monensin hingegen entkoppelt vermutlich hauptsächlich die Essig- und Propionsäure-produzierenden Mikroorganismen, worauf der rasche Anstieg beider Säuren nach Einwirkung des Hemmstoffes hindeutet. Bei hohen Monensinkonzentrationen tritt Zusammenbruch der Fermentation ein, was vermutlich durch Zusammenwirken von Übersäuerung und direkter Hemmung der methanogenen Flora bewirkt wird. Bei ständiger Zufuhr geringer Monensinmengen läßt sich eine stabile Fermentation erreichen, wobei jedoch die säurebildenden Bakterien weiterhin zumindest teilweise entkoppelt sind (erhöhte Säuregehalte).
Im Falle der Pansenfermentation wären dann unter Monensineinwirkung die Propionsäurebildner nur entkoppelt, während die Essigsäurebildner völlig gehemmt werden. Dies stimmt mit der von Chen und Wolin (1979) beobachteten unterschiedlichen Empfindlichkeit von Reinkulturen Essig- bzw. Propionsäure-bildender Mikroorganismen gegen Monensin überein.

### II. 4. 5. Wirkung von synthetischen Chemotherapeutica

Die untersuchten synthetischen Chemotherapeutica weisen unterschiedliche Wirkungsmechanismen auf. Sulfamethazin und Arsanilsäure sind Strukturanaloga der para-Aminobenzoesäure und greifen in den Folsäurestoffwechsel ein, während die mutagenen Verbindungen Furazolidon und Olaquindox vermutlich zu Brüchen in der DNA führen, nachdem sie durch bestimmte Reduktasen reduziert und damit aktiviert wurden. Die hohe Wirksamkeit von Olaquindox im Falle der Methangärung könnte auf den stark reduzierenden Bedingungen bei der Fermentation und damit verbundener hoher Aktivierung des Hemmstoffes beruhen.
Da sowohl aus der Gruppe der p-ABS-Antagonisten als auch der der mutagenen Substanzen jeweils einer der Hemmstoffe wirksam, der andere praktisch unwirksam war, liegen die Unterschiede in der Wirksamkeit dieser Fütterungszusätze auf die Methangärung nicht an ihrem unterschiedlichen Wirkungsmechanismus, sondern sind wohl eher durch unterschiedliche Stabilität oder Aufnahme durch die Mikroorganismen bedingt.

Für die Praxis ergibt sich die Konsequenz, daß bei der Verabreichung von Fütterungszusätzen, die Arsanilsäure oder Olaquindox enthalten, Störungen bei der Vergärung der Gülle hemmstoffgefütterter Tiere nicht auszuschließen sind.

II. 4. 6. Wirkung von Stalldesinfektionsmitteln

Es zeigte sich, daß von den untersuchten Präparaten in praxisrelevanten Konzentrationen nur Dekaseptol eine Hemmung der Methangärung bewirkt. Dies scheint durch den Gehalt an Chloroform oder Schwefelkohlenstoff bedingt zu sein, da durch Phenole allein die Methangärung nicht oder nur schwach beeinträchtigt wird, wie die Untersuchung des Präparates Master Mix Environ zeigte.
Dekaseptol wird jedoch als einziges der geprüften Mittel zur Desinfektion von Stallungen bei Parasitosen empfohlen (Enigk und Hilbrich, 1968; DVG, 1979). Da man also in bestimmten Fällen wohl nicht auf den Einsatz eines derartigen Mittels verzichten kann, empfiehlt es sich, Gülle mit Rückständen von Dekaseptol, wenn möglich, gar nicht in Biogasanlagen einzubringen oder zumindest mit hemmstofffreier Gülle stark zu verdünnen (z.B. in einer dem Faulbehälter vorgeschalteten Sammelgrube).

# III. DIE WIRKUNG DER IONOPHOREN ANTIBIOTIKA MONENSIN UND LASALOCID AUF REINKULTUREN METHANOGENER BAKTERIEN

## III. 1. Einleitung

Der Gesamtprozeß der Methangärung kann durch die ionophoren Wirkstoffe Monensin und Lasalocid, die elektroneutralen Kationentransport an Membranen bewirken (Reed, 1979), auf vielfältige Art und Weise beeinflußt werden.
So bewirkt Monensin, wie in Teil II dieser Arbeit bereits ausführlich besprochen, eine Veränderung der Pansenfermentation, die eine Verbesserung der Futterverwertung bei Mastrindern zur Folge hat. Ob dieser Effekt primär durch Selektion von Propionsäure-bildenden Mikroorganismen hervorgerufen wird, wie Chen und Wolin (1979) vermuteten, oder ob auch eine direkte Hemmung der methanogenen Flora im Pansen eine Rolle spielt, worauf Versuche mit Reinkulturen methanogener Bakterien hindeuteten (Hilpert et al., 1981), ist nicht endgültig geklärt.
Auch die Vergärung von Rindergülle (Varel und Hashimoto, 1981 und 1982) und Klärschlamm (siehe Teil II dieser Arbeit) wird durch Monensin oder Lasalocid beeinflußt. Bemerkenswert ist, daß die beiden Hemmstoffe hierbei sehr unterschiedliche Wirkungen zeigen. Während Monensin eine Zunahme der Gärungssäuren und eine Abnahme der Methanproduktion bis hin zum Zusammenbruch der Fermentation bewirkt, wird der Gärprozeß sowohl bei Rindergülle als auch bei Klärschlamm durch vergleichbare Konzentrationen von Lasalocid nicht gehemmt. Bei der Klärschlammvergärung wird bei Anwendung von Lasalocid im Gegenteil eine Steigerung der Methanausbeute beobachtet (Teil II).

So ergeben sich allein aus der praktischen Anwendung von Monensin und Lasalocid in der Tierfütterung Fragen nach der genauen Wirkungsweise dieser Hemmstoffe gegen methanogene Bakterien. Jedoch führt auch die besondere Stellung der Methanbakterien innerhalb der Prokaryonten zu interessanten Fragestellungen.

Die Methanbakterien werden aufgrund verschiedener Merkmale in ihrem Bau und ihrem Stoffwechsel (Basensequenz der 16S-rRNA, Zusammensetzung der Zellwände und Membranlipide, Besitz spezi-

eller Coenzyme) einem dritten Organismenreich zugeordnet, den Archaebakterien (Woese et al., 1978; Kandler, 1979 und 1981). Speziell aufgrund der besonderen Zusammensetzung der Zellmembranen, die anstelle der Glycerin-Fettsäureester eubakterieller Membranen Diglycerintetraether aus Glycerin und isoprenoiden Alkylketten enthalten (Tornabene et al., 1978 und 1979), war es von Interesse, ob die ionophoren Substanzen Monensin und Lasalocid auch hier eine Erhöhung der Kationendurchlässigkeit der Membranen bewirken.

Wenn die Hemmstoffe auch an den Membranen der Methanbakterien ihre ionophoren Wirkungen ausüben, könnte auch der Energiestoffwechsel dieser Organismen durch sie beeinflußbar sein. Methanogene Organismen sind in der Lage, ihren Energiebedarf durch die Reduktion von Kohlendioxid zu Methan mit Wasserstoff als Elektronendonor zu decken (Thauer et al., 1977). Dementsprechend ist die Methanbildung mit einer Zunahme des ATP-Gehaltes in den Zellen verbunden (Roberton und Wolfe, 1970; Sauer et al., 1979) und es gibt Hinweise darauf, daß die ATP-Synthese über einen chemi-osmotischen Mechanismus (Mitchell, 1961) an den anaeroben Elektronentransport gekoppelt ist. So konnte durch das Anlegen eines künstlich hervorgerufenen Protonengradienten an Membranen methanogener Bakterien ATP-Synthese bewirkt werden (Mountfort, 1978; Doddema et al., 1978 und 1979). Auch ein Kalium-Gradient an Membranvesikeln von Mb. thermoautotrophicum bewirkte ATP-Synthese (Doddema et al., 1979). Allerdings fanden Jarrell und Sprott (1981) bei Untersuchungen an Mb. thermoautotrophicum und Msp. hungatei, daß diese Organismen an ihren Zellmembranen zwar eine Potentialdifferenz, jedoch keinen pH-Gradienten ausbilden. Beide genannten methanogenen Keime zeigen auch eine deutliche Anhäufung von Kalium im Zellinneren (Sprott und Jarrell, 1981).

Im Folgenden wird über die Wirkungen beider Hemmstoffe auf Wachstum, Methanbildung, Kationenpermeabilität und ATP-Gehalt methanogener Bakterien berichtet.

## III. 2. Material und Methoden

### III. 2. 1. Organismen

Die verwendeten Mikroorganismen und deren Herkunft sind nachfolgend tabellarisch aufgeführt.

Tab 10: Mikroorganismen und deren Herkunft

| Name | Nummer | Herkunft |
|---|---|---|
| Methanobacterium bryantii M.o.H.$_G$ | DSM 862 | Dr. R.S. Wolfe, Dept. of Microbiology, Univ. of Illinois, Urbana, USA |
| Methanobacterium formicicum | DSM 1535 | " " |
| Methanobrevibacter smithii PS | DSM 861 | " " |
| Methanospirillum hungatei | DSM 864 | " " |
| Methanococcus vannielii | DSM 1224 | Deutsche Sammlung f. Mikroorganismen, Göttingen, BRD |
| Bacillus subtilis W 23 | | Prof. Dr. F. Fiedler, Inst. f. Mikrobiologie Univ. München, BRD |

### III. 2. 2. Hemmstoffe

Die untersuchten Hemmstoffe, deren Herkunft und die verwendeten Lösungsmittel sind in der folgenden Tabelle verzeichnet.
Mit den angegebenen Lösungsmitteln wurden Stammlösungen der Hemmstoffe hergestellt; diese wurden zur Anwendung mit Wasser geeignet verdünnt. Die fertigen Verdünnungen wurden für alle Versuche 15 min mit $N_2$ begast und anschließend gasdicht verschlossen. Für die Wachstumsversuche wurden die Hemmstofflösungen anschließend mit Hilfe von Einmal-Sterilfiltern (Sartorius SM 16527) in einer Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products Inc., Ann Arbor, USA) sterilisiert.

Tab. 11: Zusammenstellung der untersuchten Hemmstoffe

| Hemmstoff | Herkunft | Lösungsmittel |
|---|---|---|
| Monensin | Fa. Calbiochem, La Jolla, Kanada | Äthanol |
| Lasalocid | Prof. Dr. W. Hammes, Univ. Hohenheim, BRD | Äthanol |
| CCCP | Fa. Sigma, München, BRD | Äthanol |
| 2,4 DNP | Fa. Sigma, München, BRD | Aceton |
| Gramicidin | Fa. Sigma, München, BRD | Äthanol |
| $NH_4Cl$ | Fa. Merck AG, Darmstadt, BRD | Wasser |

III. 2. 3. Medien

Alle zur Herstellung der Medien verwendeten Präparate stammten von der Fa. Merck AG, Darmstadt, mit Ausnahme von:
L-Cystein-Hydrochlorid Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
Resazurin Fa. Sigma, München, BRD

Alle Puffer und Medien mit Ausnahme von HD-Medium wurden durch Aufkochen unter $N_2$-Spülung vorreduziert. Anschließend wurde das im Rezept angegebene Reduktionsmittel zugegeben. Alle weiteren Schritte wurden in einer Anaerobenkammer unter $H_2/N_2$-Atmosphäre (5:95) durchgeführt.

a) HD-Medium: 10g Pepton, 5g Hefeextrakt, 5g Glucose, 5g NaCl, 10g Agar in 1000ml entionisiertem Wasser lösen, pH mit NaOH auf 7,4 einstellen, 20 min autoklavieren, in Petrischalen abfüllen.

b) MS-Medium: Nach Hammes et al., 1979.

c) Kalium-armes MS-Medium: 0,23g $Na_2HPO_4$; 0,23g $NaH_2PO_4$; 0,23g $(NH_4)_2SO_4$; 0,45g NaCl; 0,09g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 0,06g $CaCl_2 \times 2H_2O$; 5g Natriumacetat; 1ml $FeSO_4 \times 7H_2O$ 0,2%; 1ml $Ni(NH_4)_2(SO_4)_2$ 0,2%; 10ml vitamin solution (Wolin et al., 1963); 10ml mineral solution (Wolin et al., 1963); 6g $NaHCO_3$; 1ml Resazurin 0,1%;

mit entionisiertem Wasser auf 1000ml auffüllen, nach Aufkochen unter $N_2$ 40ml Reduktionsmittel zugeben, gasdicht verschließen und 20min autoklavieren.
Reduktionsmittel: 3g NaOH in 1000ml $H_2O$ lösen, unter $N_2$-Spülung zum Kochen bringen, 12,5g Cystein-Hydrochlorid und 12,5g $Na_2S \times 9H_2O$ zugeben, gasdicht verschließen.

Natrium-armes MS-Medium: 0,3g $K_2HPO_4$; 0,48g $KH_2PO_4$; 0,3g KCl; 0,12g $MgSO_4 \times 7H_2O$; 0,08g $CaCl_2 \times 2H_2O$; 20ml Essigsäure 20%; 1ml $FeSO_4 \times 7H_2O$ 0,2%; 1ml $Ni(NH_4)_2(SO_4)_2$ 0,2 %; 10ml vitamin solution (Wolin et al., 1963); 10ml mineral solution (Wolin et al., 1963); 7,5g $KHCO_3$; 1ml Resazurin 0,1%; 1,7g KOH;
800ml $H_2O$ und KOH vorlegen, dann $KHCO_3$ und Essigsäure zugeben, dann restliche Bestandteile zufügen und mit $H_2O$ auf 1000ml auffüllen. pH mit KOH oder Essigsäure auf 6,5 einstellen, unter $N_2$-Spülung aufkochen, 40ml Reduktionsmittel zugeben, gasdicht verschließen und 20min autoklavieren.
Reduktionsmittel: 8g KOH in 1000ml $H_2O$ lösen, unter $N_2$-Spülung aufkochen, 25g Cystein-Hydrochlorid zugeben und gasdicht verschließen.

III. 2. 4. Analytik

a) Ionenbestimmungen:

Die Bestimmung von Natrium und Kalium wurde in einem Flammenphotometer (Eppendorf) durchgeführt. Das Probenmaterial wurde 2min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert; anschließend wurde der klare Überstand direkt in das Gerät eingesaugt. Die Ermittlung der jeweiligen Ionenkonzentration erfolgte durch Vergleich mit Eichkurven, die zu jeder Versuchsreihe neu erstellt wurden. Bei Konzentrationen über 30mg/l (K) bzw. 40mg/l (Na) wurden die Proben nach der Zentrifugation mit bidestilliertem Wasser verdünnt.

b) Gasanalysen:

Der $CH_4$-Gehalt in der Gasphase über den jeweiligen Versuchsansätzen wurde gaschromatographisch, wie unter II. 2. 4. beschrieben, bestimmt. Bei Gasanalysen während Wachstumsversuchen wurden die Proben steril entnommen, was durch Abflammen der Verschlußstopfen und der Entnahmekanüle erreicht wurde.

c) Wachstumsmessung:

Das Wachstum von Kulturen wurde turbidimetrisch durch Messung der Extinktion bei $\lambda$ = 578nm direkt in den Kulturröhrchen bestimmt (Geräte: Gilson Spektralphotometer STASAR II und Bausch & Lomb Spektralphotometer SPECTRONIC 21).

d) Bestimmung des Zelltrockengewichtes von Zellsuspensionen:

Je nach Dichte der zu untersuchenden Suspension wurden 5 bis 20ml der Zellsuspension auf einer Filterbank über Polycarbonat-Filter mit 0,4µm Porenweite (Nucleopore Nr. 110607) abgesaugt. Als Kontrolle wurden entsprechende Mengen des verwendeten Mediums ebenso behandelt. Die Filter wurden bis zur Gewichtskonstanz bei 105°C getrocknet und anschließend gewogen. Aus der Differenz zwischen Kontrolle und beladenem Filter ergab sich direkt das Zelltrockengewicht im eingesetzten Probevolumen.

e) ATP-Bestimmung:

Die ATP-Messungen konnte ich im Arbeitskreis von Prof. Dr. K.O. Stetter an der Universität Regensburg durchführen. Hierbei wurde der Luciferin-Luciferase-Test (System LUMIT, Lumac B.V., Niederlande) angewendet.

0,1ml Probevolumen wurde 1min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde sofort abgehoben, zum Pellet wurden 10µl "Nucleotide Releasing Reagent for Microbial Cells" (Lumit NRB, Nr. 4015) gegeben. Nach 10sec Mischen auf einem Circomix (Braun Melsungen) wurden 20µl Lumit-Puffer (Nr. 4200) und 50µl bidestilliertes Wasser zugegeben und erneut gemischt. Durch Zugabe von 25µl Luciferin-Luciferase-Reagenz (Lumit PM, Nr. 4103) wurde die Reaktion gestartet. Sofort anschließend wurde das entstehende Licht in einem hochempfindlichen Scintillationszähler (Biocounter M 2010) 10 sec lang gemessen. Durch Zugabe von ATP-Standards (Nr. 4400) zum selben Versuchsansatz wurde das System geeicht. Unter den gewählten Bedingungen entsprachen 36900 Impulse einer Menge von 10ng ATP.

## III. 2. 5. Versuchsdurchführung

Alle Arbeitsschritte "unter anaeroben Bedingungen" oder "in einer Anaerobenkammer" wurden in einer Anaerobenkammer der Fa. Coy Laboratory Products Inc., Ann Arbor, USA, unter einer Atmosphäre von 95% $N_2$ und 5% $H_2$ (Formiergas) durchgeführt.
Alle Be- und Entgasungsvorgänge wurden mit Hilfe einer Gasstation (Balch et al., 1979) durchgeführt. Folgende Gase standen zur Verfügung: $N_2$; Gemisch $N_2$:$CO_2$ 80:20 (v:v); Gemisch $H_2$:$CO_2$ 80:20 (v:v). Die Gase wurden vor Gebrauch bei 280°C über Kupferspäne geleitet, um eventuell vorhandenen Sauerstoff zu beseitigen. Alle Gase und Gasgemische wurden von der Fa. Linde, Höllriegelskreuth, BRD, bezogen.

a) Wachstumsversuche
Serumröhrchen (Balch et al., 1979) mit 7ml MS-Medium unter einer $H_2/CO_2$-Atmosphäre von 2,5bar Druck wurden mit 0,2ml einer entsprechenden Verdünnung der Hemmstofflösungen versetzt und mit 0,3ml einer Vorkultur des Testorganismus in MS-Medium beimpft. Die Röhrchen wurden bei 37°C unter leichtem Schütteln bebrütet. Zu verschiedenen Zeiten wurde die Trübung der Kultur direkt in den Röhrchen bestimmt.

b) Versuche zur Alterung der Hemmstoffe
Die Kulturröhrchen wurden nach Zugabe der Antibiotika und vor Animpfung 1 bis 6 Tage bei 37°C geschüttelt. Dann wurde wie bei a) angeimpft und das Wachstum verfolgt.

c) Test auf Selektion von resistenten Zellen
0,5ml Zellsuspension aus Kulturröhrchen, in denen Zellen unter Einfluß eines Antibiotikums gewachsen waren, wurden in frische, Antibiotikum-haltige Röhrchen eingeimpft; das Wachstum wurde wiederum turbidimetrisch gemessen.

d) Test auf Inaktivierung der Antibiotika durch die wachsende Kultur
i. Neuanimpfung von Überständen
Kulturröhrchen, in denen Zellen unter Einfluß von Antibiotikum gewachsen waren, wurden 5min bei 3500Upm in einer Runne-Zentrifuge abzentrifugiert und anschließend vorsichtig, ohne das Pellet aufzuwirbeln, in eine Anaerobenkammer gebracht. Dort wurden die Röhrchen geöffnet, der Überstand wurde mit Hilfe einer Spritze und eines Einmal-Sterilfilters (Sartorius SM 16527) in einem Arbeitsgang sterilfiltriert und in frische, leere und sterile Kulturröhrchen überführt. Je nach Versuchsansatz wurde noch frisches MS-Medium steril zugegeben, dann wurde mit dem Testkeim angeimpft. Das Wachstum wurde auch hier direkt in den Kulturröhrchen turbidimetrisch bestimmt. Als Sterilkontrolle wurden unbeimpfte, sterilfiltrierte Überstände, mit frischem MS-Medium versetzt, mitgeführt.

ii. Biotest mit Bacillus subtilis

Methanobrevibacter smithii PS wurde in 120ml-Serumflaschen in 30ml MS-Medium unter einer Atmosphäre aus $H_2$ und $CO_2$ (80:20) bei einem Druck von 1,5bar angezogen. Die Ansätze enthielten 10mg Lasalocid/l oder 50 bzw. 10mg Monensin/l. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben von je 3ml aus den Ansätzen entnommen. Mit 1ml der Probe wurde zur Erstellung einer Wachstumskurve die Extinktion bei 578nm in einem Eppendorf Filterphotometer gemessen; die restlichen 2ml wurden, um für den Biotest wirksame Antibiotikakonzentrationen zu erreichen, im Vakuum fast bis zur Trokkenen eingeengt und anschließend in 100µl 10%igem Äthanol wieder aufgenommen. 65µl dieses Konzentrates wurden auf Antibiotika-Testplättchen (Schleicher und Schüll, Nr. 2668/2) aufpipettiert; diese Testplättchen wurden auf einen Keimagar mit Bacillus subtilis W23 in HD-Medium aufgelegt und nach 3h Diffusionszeit bei 4°C 24h lang bei 37°C bebrütet. Mittels einer mit verschiedenen Hemmstoffverdünnungen erstellten Eichkurve wurde anhand der Größe der entstandenen Hemmhöfe die Konzentration von aktivem Antibiotikum ermittelt. Als Kontrollen wurden Proben aus Ansätzen ohne Antibiotikum mitgeführt.

e) Aufschluß methanogener Zellen zur Bestimmung des K-Gehaltes

Eine am Ende der log-Phase befindliche Kultur des zu untersuchenden Keimes wurde 20min bei 18000 x g (Zentrifuge WKF G 50 K) unter anaeroben Bedingungen abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1/10 Volumen (bezogen auf das Anzuchtmedium) K-armem MS-Medium aufgenommen. Sofort anschließend wurde aus dem Überstand dieser Suspension eine K-Bestimmung durchgeführt. Dieser Wert wurde von dem nach Aufschluß der Zellen erhaltenen Wert abgezogen, um ein korrektes Ergebnis für das in den Zellen enthaltene Kalium zu erhalten (cf. Herbert et al., 1971). Ein Aliquot der Zellsuspension wurde nun zweimal in einer French-Press (Aminco) mit einem Druck von 1400 atm behandelt und anschließend nach Zugabe von HCl bis zu einer Endkonzentration von 0,2mol/l 15 min leicht gekocht. Nach Zentrifugation in einer Tischzentri-

fuge wurde der K-Gehalt im klaren Überstand bestimmt.

f) Versuche zum Austritt von Kalium aus den Zellen

Die Zellen wurden wie unter e) beschrieben abzentrifugiert und unter Einhaltung anaerober Bedingungen in 1/10 Volumen K-armem MS-Medium aufgenommen, um Zellsuspensionen mit einem Trockengewicht von ca. 1mg/ml zu erhalten. 10ml-Portionen dieser Suspension wurden auf 120ml-Serumflaschen verteilt; diese Ansätze erhielten eine $H_2/CO_2$-Gasphase mit einem Druck von 2bar. 3h nach Aufschwemmung der Zellen in K-armem MS-Medium wurden die Hemmstoffe (0,2ml einer geeigneten Verdünnung) zugegeben. Die Ansätze wurden bei 37°C leicht geschüttelt; zu verschiedenen Zeiten vor und nach Hemmstoffzugabe wurden der K-Gehalt im Medium und der $CH_4$-Gehalt in der Gasphase bestimmt.

g) Zugabe der Hemmstoffe zu wachsenden Kulturen

Wie unter a) beschrieben wurden die Versuche in MS-Medium in Serumröhrchen bei 37°C durchgeführt. Nachdem eine optische Dichte von ca. 0,2 erreicht war, wurden 0,2ml geeignet verdünnte Hemmstofflösung zugesetzt. Zu verschiedenen Zeiten vor und nach Hemmstoffzugabe wurden die Trübung des Röhrchens und der $CH_4$-Gehalt in der Gasphase bestimmt. Um kurz nach Zugabe der Hemmstoffe eine möglichst empfindliche Bestimmung des gebildeten Methans durchführen zu können, wurde die Gasphase in den Röhrchen kurz vor Hemmstoffzugabe an der Gasstation gegen frisches $H_2/CO_2$-Gemisch ausgetauscht.

## III. 3. Ergebnisse

### III. 3. 1. Hemmung des Wachstums methanogener Bakterien durch Monensin und Lasalocid

In Vorversuchen (Plattendiffusionstest auf MS-Medium mit Reinkulturen methanogener Bakterien; cf. Hilpert et al., 1981) hatten sich alle untersuchten Methanbakterien als empfindlich gegen Lasalocid und, mit Ausnahme von Mbr. smithii PS, auch Monensin erwiesen (Tab. 12 ).

Tab. 12: Empfindlichkeit von Archaebakterien gegen Antibiotika im Plattendiffusionstest
(Zahlen: Hemmzone in mm; -: keine Hemmung; o: nicht bestimmt; aus Hilpert et al., 1981)

| | | Archaebacteria | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Eubacteria | | | | Eucaryotes | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Halophiles | | | | | | | | Methanogens | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Target | Antibiotic | Hfx. halobium | Hfx. volcanii | Hfx. salinarium | Hfc. vanniellii CCM 827 | Hfc. vanniellii CCM 859 | Hfc. vanniellii CCM 2256 | Hfc. vanniellii CCM 2526 | Hfc. spec. P-1 | Mbr. ruminantium AZ | Mbr. smithii | Mbr. bryantii | Mbr. bryantii M.o.H.G. | Mbr. formicicum | Mbc. thermoautotrophicum -JH | Mbc. thermoautotrophicum -S | Mbr. vannielii | Meth. hungatei | Mtr. barkeri | E. coli | Staph. aureus | Bac. subtilis | Mbr. luteus | Sacch. cerevisiae | Haematoc. spec. |
| Cell wall | Fosfomycin | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 10 | 12 | 4 | 18 | – | – |
| | D-Cycloserine | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 9 | – | – | 13 | 16 | 15 | 13 | – | – |
| | Vancomycin | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 10 | 14 | 4 | – | – |
| | Penicillin G | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 7 | 26 | 11 | 29 | – | – |
| | Cephalosporin C | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 2 | 22 | 11 | 9 | – | – |
| | Nocardicin A | – | – | – | – | – | – | – | – | 2 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 2 | – | 7 | – | – | – |
| | Bacitracin | 9 | – | 19 | 2 | 18 | 14 | 18 | – | 23 | 40 | 27 | 17 | 40 | 40 | 40 | 17 | – | – | – | 8 | 2 | 11 | – | – |
| | Gardimycin | 2 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | – | 19 | 30 | 16 | 14 | 24 | 14 | 6 | – | – | – | – | 3 | 2 | 8 | – | – |
| | Nisin | – | – | 4 | – | – | – | – | – | 8 | 11 | 8 | 5 | 10 | 15 | 10 | 3 | – | – | – | 3 | – | 8 | – | – |
| | Enduracidin | – | – | – | – | – | – | – | – | 14 | 20 | 16 | 14 | 20 | 17 | 10 | 5 | – | 8 | – | 10 | 4 | 5 | – | – |
| | Flavomycin | 5 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 6 | – | – | – | – | – | – | 3 | 16 | 8 | 5 | – | – |
| | Subtilin | – | – | 8 | – | – | – | – | – | – | 4 | 7 | – | 6 | – | 5 | 10 | – | – | – | 6 | 2 | 6 | – | – |
| RNA-Polymerase | α-Amanitin | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | o | – | o | o | o | o | o | o | o |
| | Rifampicin | – | – | 3 | – | – | 2 | 2 | – | 2 | 2 | – | – | 2 | – | – | 2 | – | – | 9 | 22 | 5 | 16 | – | – |
| Protein Biosynthesis | Cycloheximid | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 23 | 22 |
| | Chloramphenicol | – | – | – | – | – | – | – | – | 11 | 25 | 13 | 40 | 12 | o | 22 | 28 | 4 | 40 | 11 | 10 | 4 | 10 | – | – |
| | Virginiamycin | 3 | 2 | 4 | 3 | 3 | 3 | 4 | – | – | 9 | 14 | 9 | 9 | – | – | 15 | – | – | 5 | 19 | 15 | 15 | – | – |
| | Gentamycin | 3 | – | 2 | – | – | – | – | – | 13 | – | 25 | – | 12 | o | 12 | – | – | – | 9 | 13 | 18 | 10 | – | – |
| | Tetracyclins | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 3 | 8 | 8 | – | – | 13 | 18 | 7 | 12 | – | – |
| | Oleandomycin | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 13 | 8 | 15 | – | – |
| | Erythromycin | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 3 | – | – | 3 | 17 | 11 | 15 | – | – |
| | Kanamycin | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 9 | 13 | 7 | 8 | – | – |
| Membranes | Gramicidin S | – | – | – | – | – | – | – | – | 5 | 7 | 7 | 5 | 7 | 11 | 15 | 10 | 4 | 16 | – | 4 | – | 5 | 3 | 4 |
| | Gramicidin D | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 16 | 11 | – | – | – | – | 4 | – | – | – | – |
| | Polymyxin | – | – | – | – | – | – | – | – | 4 | – | – | – | – | 8 | 8 | – | – | – | 5 | – | – | 4 | 4 | 3 |
| | Amphotericin B | – | 4 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 3 | 6 | 5 |
| | Valinomycin | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 2 | 2 | – | – | – | – |
| | Nonactin | 5 | – | 7 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | 2 | 5 | – | – | – | – |
| | Monensin | 2 | 4 | 6 | 2 | 3 | 4 | 3 | 2 | – | – | 5 | 10 | 4 | 35 | 25 | 12 | 15 | 25 | – | 6 | 3 | 10 | – | – |
| | Lasalocid | – | 6 | 2 | 2 | 4 | 3 | 2 | 2 | 19 | 22 | 25 | 30 | 40 | 35 | 42 | 21 | 40 | 40 | – | 15 | 8 | 15 | – | – |

Zur Bestimmung der wirksamen Konzentrationen beider Hemmstoffe wurden Wachstumsversuche in Serumröhrchen mit verschiedenen Antibiotikakonzentrationen durchgeführt. Als Testorganismen dienten Mc. vannielii, Msp. hungatei, Mb. bryantii M.o.H.$_G$ und Mbr. smithii PS.

Das Wachstum von Mc. vannielii wird von beiden Antibiotika bereits durch die niedrigste untersuchte Konzentration von 1mg/l vollständig unterbunden; auch nach 120h Bebrütung tritt keine Trübung im Kulturröhrchen auf, während die Kontrolle bereits nach 60h eine OD von 1,2 aufweist.

Msp. hungatei wird durch 1mg Lasalocid/l ebenfalls völlig gehemmt. Monensin läßt in dieser niedrigen Konzentration noch schwaches Wachstum zu (nach 90h Bebrütung OD von 0,4; Kontrolle nach 60h OD von 0,9). 10mg Monensin/l wirken auch hier völlig wachstumshemmend.

Die Ergebnisse für Mb. bryantii M.o.H.$_G$ sind in Abb. 21 gezeigt. Völlige Hemmung tritt wiederum auf bei 10mg Monensin/l und 1mg Lasalocid/l. Bei einer Monensinkonzentration von 1mg/l findet deutliches Wachstum statt, jedoch ist die lag-Phase um ca. 10h verlängert und die Endzelldichte der Kontrolle wird nicht ganz erreicht.

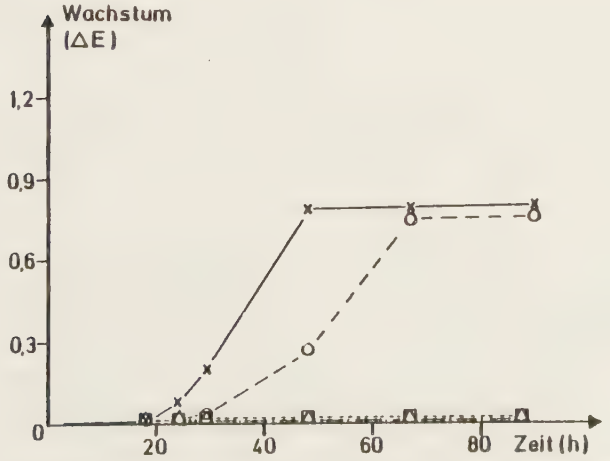


Abb. 21: Einfluß von Monensin bzw. Lasalocid auf das Wachstum von Mb. bryantii M.o.H.$_G$

( x Kontrolle; O 1mg Monensin/l; □ 10mg Monensin/l; Δ 1mg Lasalocid/l)

Das Verhalten von Mbr. smithii PS ist in den Abb. 22 und 23 gezeigt. Durch Monensin läßt sich bei keiner der drei getesteten Konzentrationen (1, 10 und 100mg/l) eine komplette Hemmung erreichen, was gut mit der Unempfindlichkeit dieses Keimes im Plattendiffusionstest übereinstimmt (vgl. Tab. 10). Auch hier ist jedoch die lag-Phase deutlich verlängert (bei 10 und 100mg/l) und die Endzellzahl nimmt mit Steigerung der Antibiotikakonzentration ab(Abb. 22).

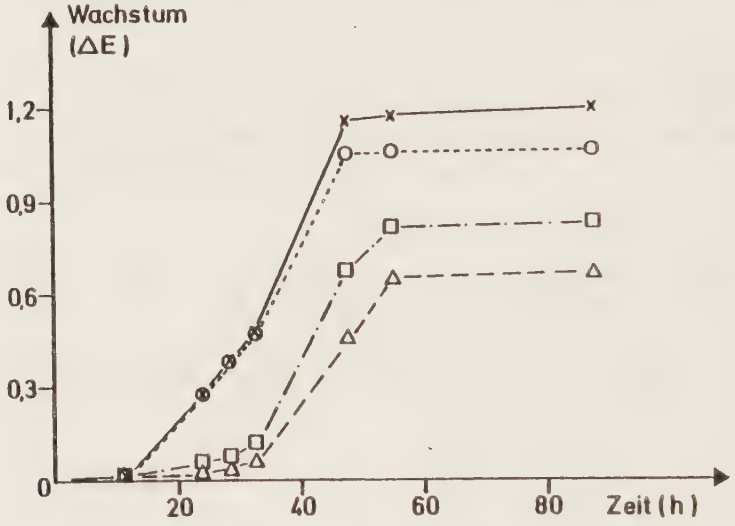


Abb. 22: Einfluß von Monensin auf das Wachstum von Mbr. smithii PS
( x Kontrolle; O 1mg Monensin/l; □ 10mg Monensin/l
Δ 100mg Monensin/l)

Lasalocid hemmt in einer Konzentration von 100mg/l das Wachstum von Mbr. smithii PS völlig, bei 10 und 1mg/l tritt die schon bei Monensin beobachtete Erholung des Wachstums bei verringerter Endzelldichte auf (Abb. 23).
Der Hemmeffekt von Lasalocid ist bei gleichen Konzentrationen sowohl bei Mb. bryantii M.o.H.$_G$ als auch bei Mbr. smithii PS stärker als der von Monensin.

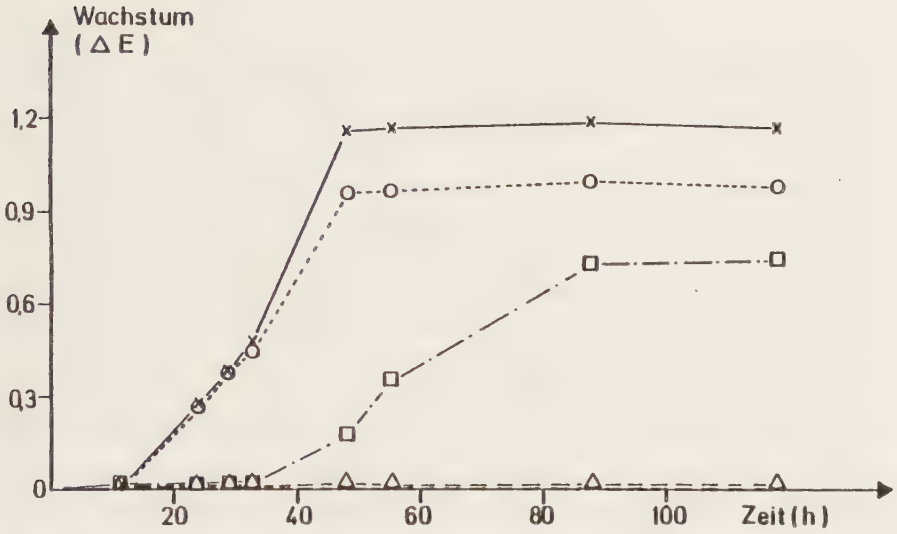


Abb. 23: Einfluß von Lasalocid auf das Wachstum von Mbr. smithii PS
( x Kontrolle; O 1mg Lasalocid/l; □ 10mg Lasalocid/l;
Δ 100mg Lasalocid/l)

### III. 3. 2. Versuche zum Abbau der Hemmstoffe und zur Selektion resistenter Zellen.

Die unter III. 3. 1. beschriebene "Erholung" des Wachstums von Mbr. smithii PS unter dem Einfluß von Monensin und Lasalocid ist Gegenstand der folgenden Untersuchungen. Es sind drei Möglichkeiten denkbar, die ein derartiges Phänomen bedingen können: 1. Zerfall oder Inaktivierung des Hemmstoffes unter den gewählten Versuchsbedingungen (ohne Einfluß der Organismen), 2. Selektion von resistenten Zellen und 3. Abbau oder Inaktivierung des Hemmstoffes beim Wachstum von Mbr. smithii PS.

Zum ersten Punkt wurde der Einfluß verschieden langer Schüttelzeiten (bis 6 Tage) auf unbeimpfte Röhrchen mit Antibiotikum untersucht. Nach anschließender Beimpfung und Bebrütung war weder bei Monensin noch bei Lasalocid ein Aktivitätsverlust im Vergleich zu frisch angesetzten, hemmstoffhaltigen Kulturröhrchen festzustellen.

Um zu prüfen, ob eine Selektion resistenter Zellen stattfindet, wurden in Monensin- oder Lasalocid-haltigen Nährböden vorgezogene Zellen neuerlich in Antibiotikum-haltige Kulturröhrchen überimpft.
Sowohl die in Monensin als auch die in Lasalocid gewachsenen Zellen zeigen im Vergleich zu ohne Antibiotikum vorgezogenen Zellen deutlich verzögertes Wachstum sowohl in Antibiotika-haltigen als auch in Antibiotika-freien Nährmedien. Die mit 10mg Lasalocid/l vorbehandelten Zellen wachsen bei neuerlichem Überimpfen in MS-Medium + 10mg Lasalocid/l überhaupt nicht mehr an. Dies zeigt, daß bei Wachstum in Nährmedien, die Monensin oder Lasalocid enthalten, keine resistenten Zellen selektiert worden sind, sondern daß im Gegenteil eine Schwächung oder Schädigung der Zellen auftrat.

Um festzustellen, ob die Hemmstoffe durch die Zellen selbst inaktiviert werden, wurden zwei Wege beschritten. Zum einen wurden sterilfiltrierte Überstände von Kulturen von Mbr. smithii PS in Antibiotikum-haltigen Nährmedien neuerlich mit dem Testkeim beimpft, um die hierin noch befindliche Restaktivität der Hemmstoffe zu bestimmen, zum anderen wurde die noch vorhandene antibiotische Aktivität während des Wachstums von Mbr. smithii PS in hemmstoffhaltigen Medien mit Hilfe eines Biotests (Vermessung von Hemmhöfen im Plattendiffusionstest mit Bac. subtilis als Indikatororganismus) ermittelt.
In Abb. 24 sind die Ergebnisse von Versuchen mit den sterilfiltrierten Überständen von Kulturen von Mbr. smithii PS in MS-Medium + Monensin gezeigt. Man erkennt, daß das Wachstum in den Überständen auch ohne Hemmstoff deutlich verlangsamt ist (Vergleich Kurve 1 mit 3). Der nahezu identische Verlauf der Kurven 3 und 4 zeigt jedoch, daß im Überstand der mit 10mg Monensin/l gewachsenen Kultur keine höhere Hemmaktivität mehr vorhanden ist als im Überstand der ohne Antibiotikum gewachsenen Kultur.

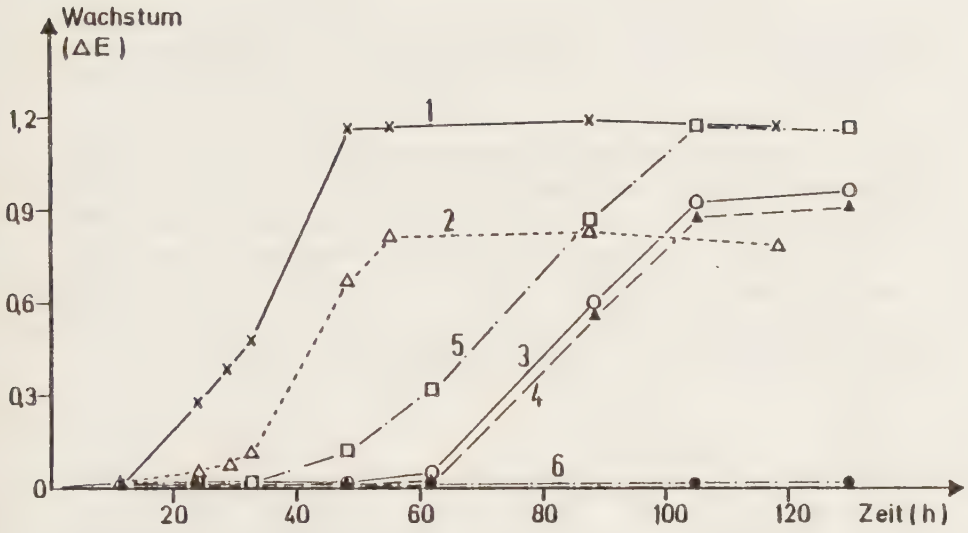


Abb. 24: Wachstum von Mbr. smithii PS in sterilfiltrierten Überständen von Kulturen desselben Organismus in MS-Medium + Monensin

(Wachstum in: × MS-Medium; Δ MS-Medium + 10mg Monensin/l; ○ Überstand einer Kultur in MS-Medium; ▲ Überstand einer Kultur in MS-Medium + 10mg Monensin/l; □ Überstand einer Kultur in MS-Medium + 100mg Monensin/l (1 Teil) + frisches MS-Medium (10 Teile); ● Überstand einer Kultur in MS-Medium + 100mg Monensin/l)

Ebenso erreicht Kurve 5 nach längerer lag-Phase die Endzellzahl von 1. Wäre die antibiotische Aktivität noch voll erhalten, so sollte die Endzellzahl nicht den in Ansatz 2 erreichten Wert überschreiten.

Aus dem Vergleich von 4 und 6 ergibt sich, daß bei einer Vorgabe von 100mg Monensin/l das Antibiotikum durch das Wachstum der ersten Kultur (Dauer 4 Tage) nicht vollständig inaktiviert wurde, da bei 6 im Gegensatz zu 4 kein Wachstum mehr beobachtet wird. Eine Menge von 10mg Monensin/l scheint jedoch in derselben Zeit total inaktivierbar zu sein (Vergleich 3 und 4).

Im Falle von Lasalocid konnte mit derartigen Versuchen keine signifikante Abnahme der antibiotischen Aktivität nachgewiesen werden.

In der Abb. 25 sind die Ergebnisse des Plattendiffusionstests mit Bac. subtilis als Testkeim gezeigt. Man erkennt, daß die wirksame Konzentration von Monensin innerhalb der ersten 50 h Bebrütung auf einen Wert abfällt, der unter der Nachweisgrenze des hier verwendeten Biotests liegt. Auch dieses Ergebnis zeigt, wie schon die Versuche mit Überständen, daß Monensin durch Mbr. smithii PS inaktiviert werden kann.

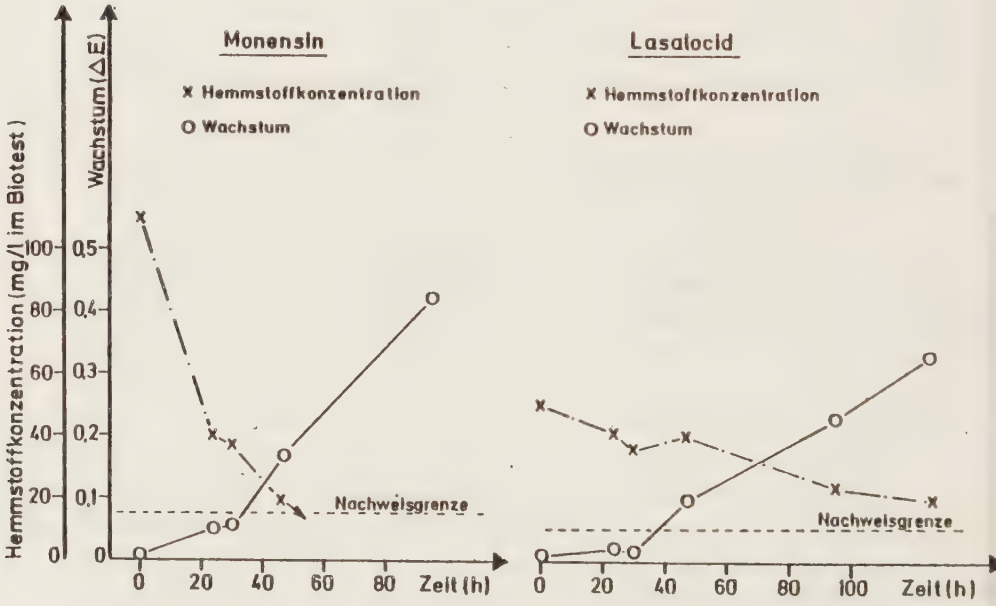


Abb. 25: Abnahme der Hemmstoffaktivität während des Wachstums von Mbr. smithii PS in MS-Medium + 50mg Monensin/l bzw. 10mg Lasalocid/l

Auch im Falle von Lasalocid findet man eine Abnahme der Hemmstoffaktivität (Abb. 25). Jedoch sind auch nach 125 h Inkubationsdauer noch Hemmhöfe im Biotest feststellbar. Dies zeigt, daß zwar eine Inaktivierung von Lasalocid durch Mbr. smithii PS stattfindet, jedoch nicht in dem Maße, wie das bei Monensin der Fall ist. Dem entspricht auch die bei gleicher Konzentration stärkere und länger andauernde Hemmwirkung von Lasalocid gegen Mbr. smithii PS in den Wachstumsversuchen.

### III. 3. 3. Austritt von Kationen aus Zellen methanogener Bakterien unter dem Einfluß von Monensin oder Lasalocid.

Um die Wirkungen von Monensin und Lasalocid auf die Kationenpermeabilität von Membranen methanogener Bakterien zu untersuchen, wurde das Austreten von Kalium in dichten Zellsuspension in K-armem Medium bei Einwirkung der Hemmstoffe gemessen. Vergleichend wurden 2,4 Dinitrophenol und $NH_4Cl$, die als Entkopplersubstanzen der oxidativen bzw. Photophosphorylierung bekannt sind, untersucht. Auch das ionophore Antibiotikum Gramicidin, das einen anderen Wirkungsmechanismus als Monensin und Lasalocid besitzt, wurde geprüft. Als Testorganismus diente Mb. bryantii M.o.H.$_G$.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Abb. 26 bis 28 gezeigt. Durch die Aufschwemmung der Zellen in K-armem Medium steigt der K-Gehalt in der Suspensionsflüssigkeit bei den einzelnen Versuchen zunächst um 3 bis 7 mg/l an. Während der anschließenden Inkubation unter $H_2/CO_2$-Atmosphäre nimmt der extrazelluläre K-Gehalt wieder leicht ab, was zeigt, daß die Zellen Kalium aufnehmen. Die anschließende Zugabe von Monensin oder Lasalocid bewirkt einen raschen Austritt von Kalium aus den Zellen, während die Zugabe von 2,4 DNP in hohen Konzentrationen nur einen langsamen, in geringen Konzentrationen überhaupt keinen Kalium-Efflux (Abb. 26) bewirkt. $NH_4Cl$ hat bis zu Konzentrationen von 100 mmol/l keinerlei Einfluß auf den Kalium-Austritt (Abb. 27).

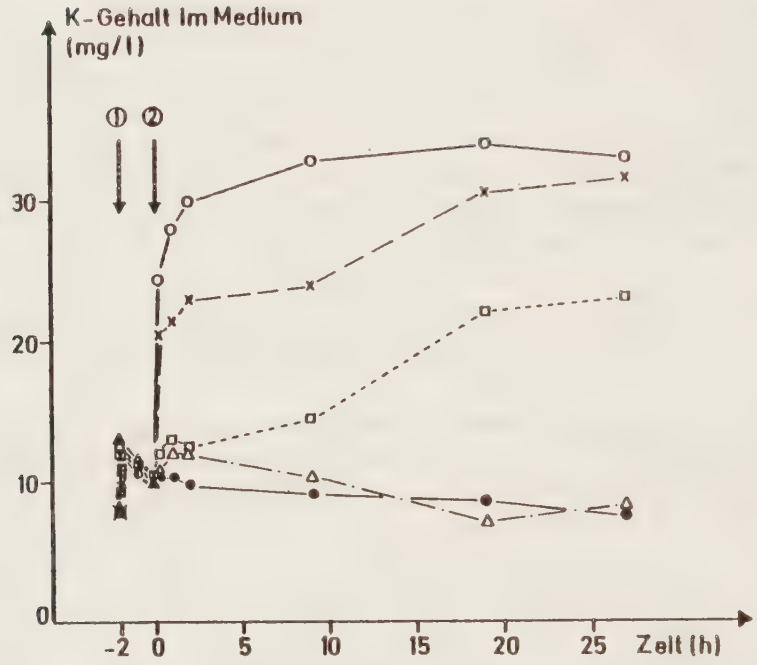


Abb. 26: Wirkung von Monensin, Lasalocid und 2,4 DNP auf das Austreten von Kalium aus Zellen von Mb. bryantii M.o.H.$_G$ in K-armem Medium
( ① Suspension der Zellen; ② Hemmstoffzugabe; O 10mg Lasalocid/l; x 10mg Monensin/l; □ 0,1mmol 2,4 DNP/l; △ 0,01mmol 2,4 DNP/l; ● Kontrolle)

Bei gleicher Konzentration bewirkt Lasalocid bei allen durchgeführten Versuchen ein etwas schnelleres und vollständigeres Austreten von Kalium als Monensin. Der Kaliumaustritt läuft vermutlich bis zum Konzentrationsausgleich, wie aus folgender Überlegung hervorgeht:

Die zu diesen Versuchen verwendeten Zellsuspensionen hatten eine Dichte zwischen 1 und 1,5 mg Zelltrockengewicht /ml. Der Kaliumgehalt von Mb. bryantii M.o.H.$_G$ wurde mit 2,3% des Trockengewichtes bestimmt. In der Zellsuspension befinden sich also zwischen 23 und 35 mg Kalium/l in den Zellen. Der Anstieg des K-Gehaltes im Medium nach Zugabe von Lasalocid liegt bei allen durchgeführten Versuchen in diesem Bereich, bei Monensin nur unwesentlich darunter.

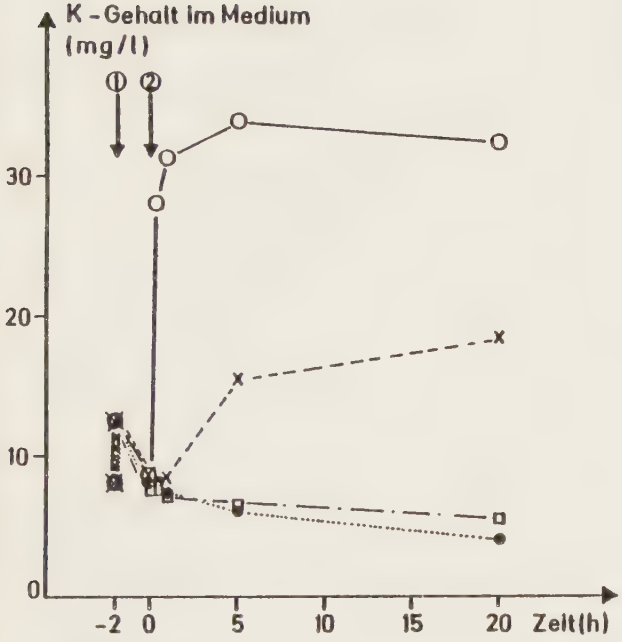


Abb. 27: Wirkung von Lasalocid und $NH_4Cl$ auf das Austreten von Kalium aus Zellen von Mb.bryantii $M.o.H._G$ in K-armem Medium

( ① Suspension der Zellen
② Hemmstoffzugabe
○ 10mg Lasalocid/l
× 300mmol $NH_4Cl$/l
□ 100mmol $NH_4Cl$/l
● Kontrolle)

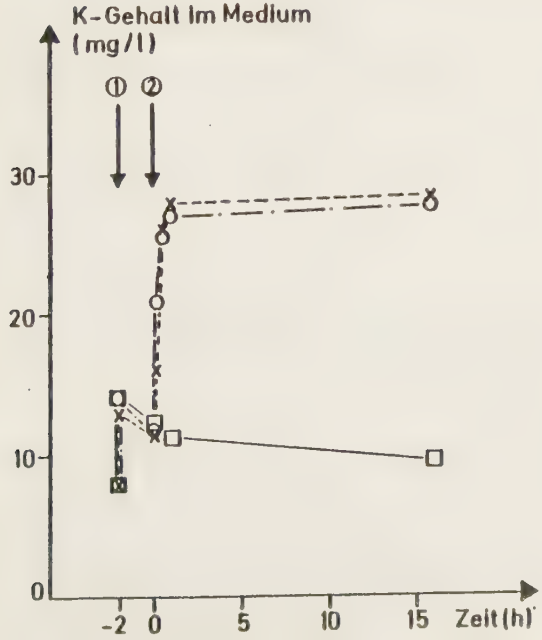


Abb.: 28: Wirkung von Monensin und Gramicidin auf das Austreten von Kalium aus Zellen von Mb. bryantii $M.o.H._G$ in K-armem Medium.

( ① Suspension der Zellen
② Hemmstoffzugabe
× 10mg Gramicidin/l
○ 10mg Monensin/l
□ Kontrolle)

Das Antibiotikum Gramicidin, das im Gegensatz zu Monensin oder Lasalocid kein Proton/Kation- oder Kation/Kation-Antiporter ist, sondern die Bildung hydrophiler Kanäle in Zellmembranen und damit freien Durchtritt von Protonen oder Kationen bewirkt ("channel-former"), ruft ebenfalls sofortigen K-Austritt aus den Zellen hervor (Abb. 28).

Ein weiteres Ergebnis dieser Versuche war, daß nach Verbrauch des Substrates ($H_2/CO_2$) in den Inkubationsansätzen auch in den nicht hemmstoffbehandelten Kontrollen der K-Gehalt im Außenmedium anstieg (nach ca. 30 h; Meßwerte nicht gezeigt). Das Aufrechterhalten der intrazellulären K-Konzentration ist also ein energieabhängiger Prozeß.

Es wurde auch versucht, Natrium-Austritt aus Zellen von Mb. bryantii M.o.H.$_G$ in Na-armem Medium zu messen. Bei Aufschwemmung der Zellen in Na-armem Medium trat eine Erhöhung der Na-Konzentration von ca. 20mg/l auf ca. 50mg/l (=ca.2,2mmol/l) auf. Bei Zugabe von Monensin oder Lasalocid wurde die Na-Konzentration im Außenmedium nicht mehr signifikant verändert.

Hierbei ist zu beachten, daß Sprott und Jarrell (1981) bei Msp. hungatei intrazelluläre Na-Konzentrationen zwischen 1 und 4mmol/l fanden. Es ist also wahrscheinlich, daß nach Aufschwemmen der Zellen gar kein Na-Konzentrationsgradient zwischen Zellinnerem und dem umgebenden Medium mehr bestand und daher die Zugabe von Ionophoren die Na-Konzentration im Außenmedium nicht mehr verändern konnte.

### III. 3. 4. Effekt von Monensin und Lasalocid auf die Methanbildung

a) Wirkung in Zellsuspensionen

Bei den oben beschriebenen Versuchen mit Zellsuspensionen in Natrium- oder Kalium-armen Medien unter $H_2/CO_2$-Gasphase hatte die Zugabe von Monensin oder Lasalocid keinen Einfluß auf die Methanproduktion, während 2,4 DNP, abhängig von der eingesetzten Konzentration, diese deutlich verringerte oder völlig zum

Erliegen brachte (Abb. 29 und 30).
Auch Gramicidin hemmte die Methanbildung völlig, während $NH_4Cl$ in keiner der untersuchten Konzentrationen (bis 300mmol/l) eine signifikante Verringerung der Methanproduktion bewirkte.

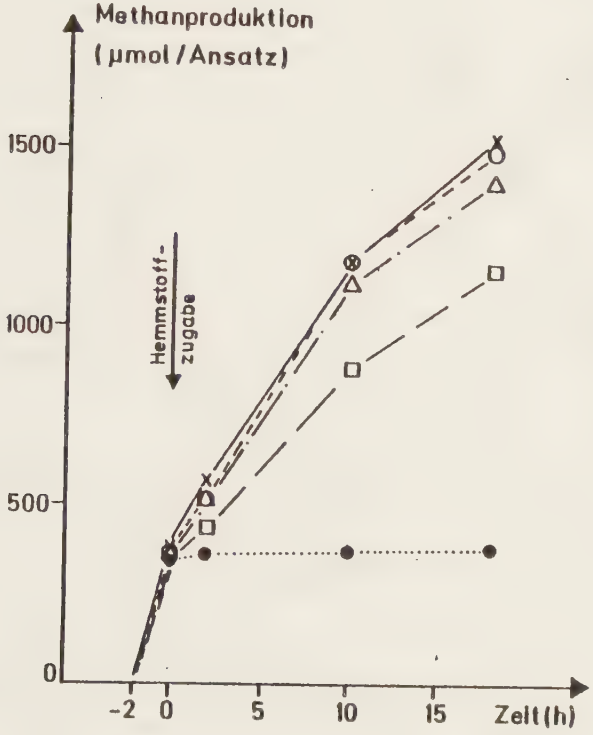


Abb. 29: Wirkung von Lasalocid, Monensin und 2,4 DNP auf die Methanproduktion einer Zellsuspension von Mb. bryantii M.o.H.$_G$ in K-armem Medium

( x Kontrolle; O 10mg Monensin/l; Δ 10mg Lasalocid/l;
□ 0,01mmol 2,4 DNP/l; ● 0,1mmol 2,4 DNP/l)

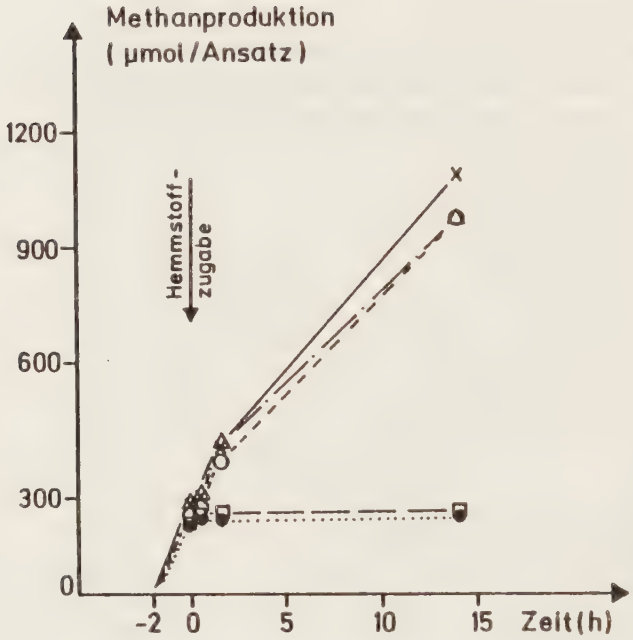


Abb. 30: Wirkung von Lasalocid, Monensin und 2,4 DNP auf die Methanproduktion einer Zellsuspension von Mb. bryantii M.o.H.$_G$ in Na-armem Medium

( x Kontrolle; Δ 1omg Lasalocid/l; O 10mg Monensin/l; □ 0,01mmol 2,4 DNP/l; ● 0,1mmol 2,4 DNP/l)

b) Wirkung bei Zugabe zu wachsenden Kulturen

Die Wirkungen von Monensin und Lasalocid auf die Methanbildung und auf die Nutzung der dabei frei werdenden Energie (Wachstum) wurden untersucht, indem die Hemmstoffe zu wachsenden Kulturen methanogener Bakterien zugegeben wurden und anschließend Wachstum und Methanproduktion weiter verfolgt wurden. Gramicidin, 2,4 DNP, $NH_4Cl$ und CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon) wurden auf die gleiche Art und Weise geprüft. Als Testorganismen dienten Mb. bryantii M.o.H.$_G$ und Mb. formicicum.

In den Abb. 31 bis 35 sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt. Sowohl Monensin als auch Lasalocid bewirken bei bei-

den Testorganismen in geeigneter Konzentration (10mg/l) eine Hemmung des Wachstums, während die Methanproduktion vermindert weiterläuft (Abb. 31; 33).

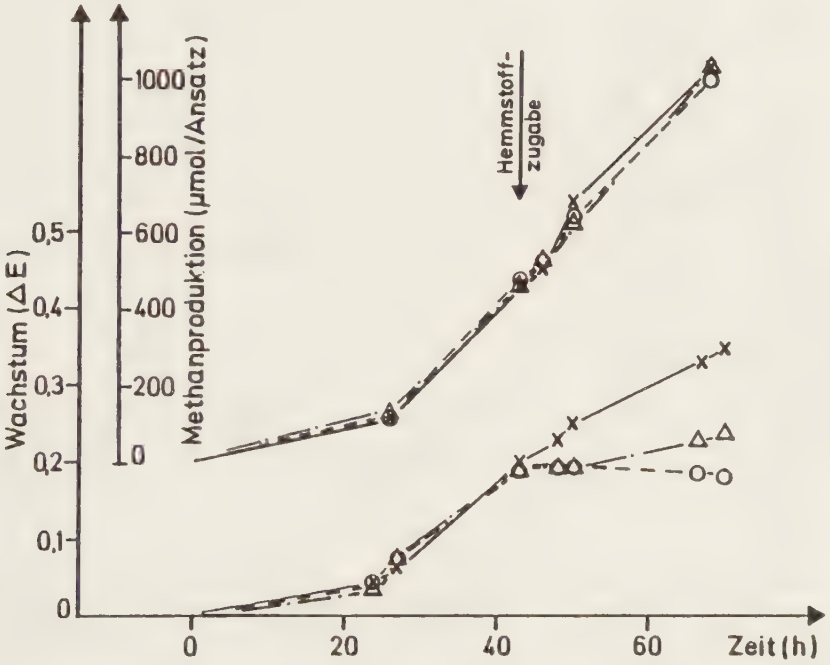


Abb. 31: Wirkung von Monensin und Lasalocid bei Zugabe zu einer wachsenden Kultur von Mb. bryantii M.o.H.$_G$
(oben Methanproduktion, unten Wachstum; x Kontrolle; Δ 10mg Monensin/l; O 10mg Lasalocid/l)

2,4 DNP hemmt in Konzentrationen, die das Wachstum verlangsamen bzw. unterbinden (bei Mb. bryantii M.o.H.$_G$ ab 0,01mmol/l; bei Mb. formicicum ab 0,1mmol/l) jeweils auch die Methanbildung (Abb. 32; 34).
CCCP zeigt in den untersuchten Konzentrationen ( 0,01 und 0,1 mmol/l) keinerlei Wirkungen. Auch $NH_4Cl$ beeinflußt in Konzentrationen von 10 und 100mmol/l weder Wachstum noch Methanproduktion. Gramicidin (10mg/l) schließlich hemmt sowohl Wachstum als auch die Methanbildung völlig (Abb. 35).

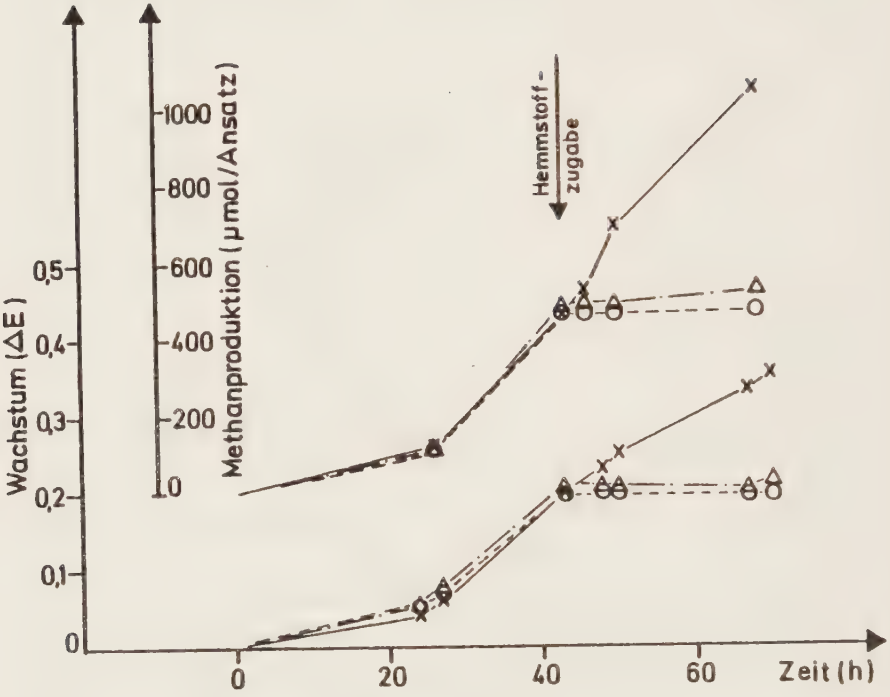


Abb. 32: Wirkung von 2,4 DNP bei Zugabe zu einer wachsenden Kultur von Mb. bryantii M.o.H.$_G$

(oben Methanproduktion, unten Wachstum; x Kontrolle;
Δ 0,01mmol 2,4 DNP/l; O 0,1mmol 2,4 DNP/l)

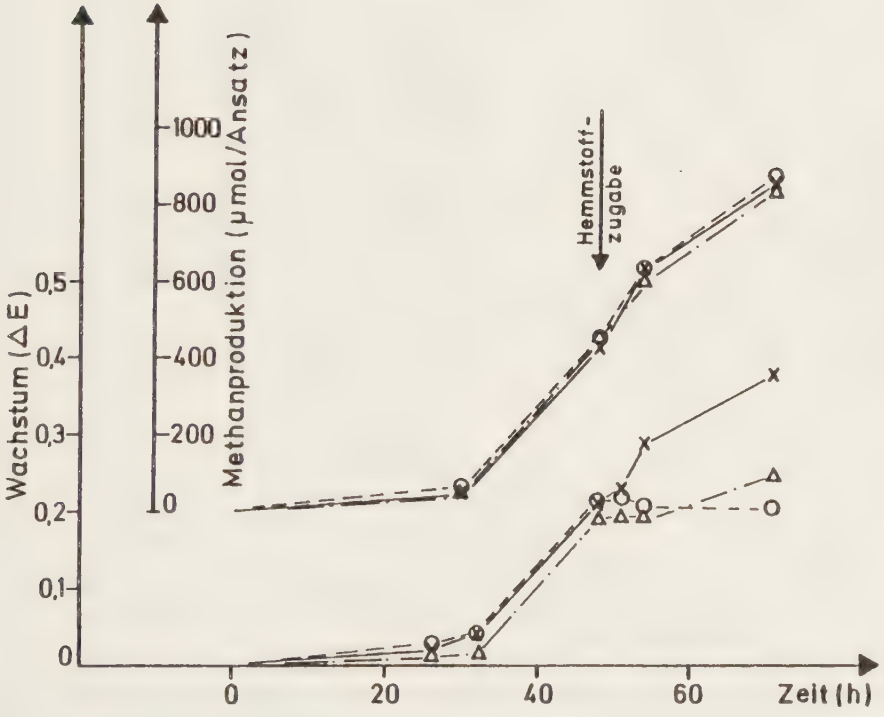


Abb. 33: Wirkung von Monensin und Lasalocid bei Zugabe zu einer wachsenden Kultur von Mb. formicicum

(oben Methanproduktion, unten Wachstum; X Kontrolle;
O 10mg Lasalocid/l; Δ 10mg Monensin/l)

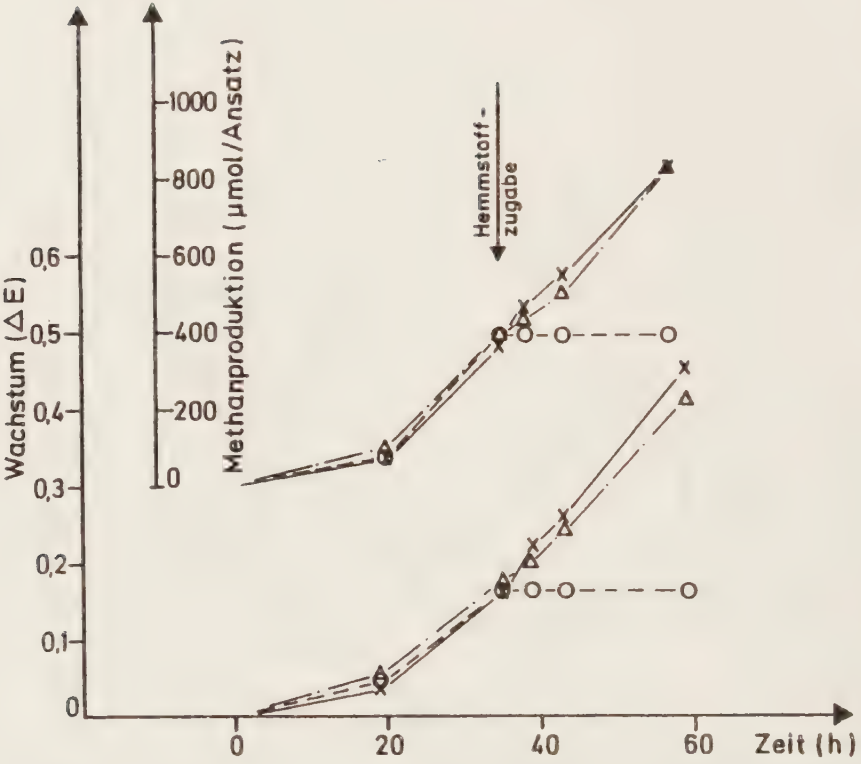


Abb. 34: Wirkung von 2,4 DNP bei Zugabe zu einer wachsenden Kultur von Mb. formicicum

(oben Methanproduktion, unten Wachstum; x Kontrolle; Δ 0,01mmol 2,4 DNP/l; O 0,1mmol 2,4 DNP/l)

Es zeigt sich hier also deutlich, daß durch die Antiporter Monensin und Lasalocid die energieliefernden Reaktionen ($CH_4$-Produktion) von der Nutzung der Energie (Wachstum) entkoppelt werden kann, während durch 2,4 DNP keine derartige Entkopplung herbeigeführt wird, sondern auch die Methanbildung unterdrückt wird. Ebenso wie 2,4 DNP bewirkt auch Gramicidin eine Hemmung sowohl des Wachstums als auch der Methanbildung.

Nun stellte sich die Frage, ob die beobachtete Wachstumshemmung tatsächlich darauf beruht, daß keine Energie in Form von ATP mehr bereit gestellt wird, oder ob andere, sekundäre Effekte hierfür verantwortlich sind.

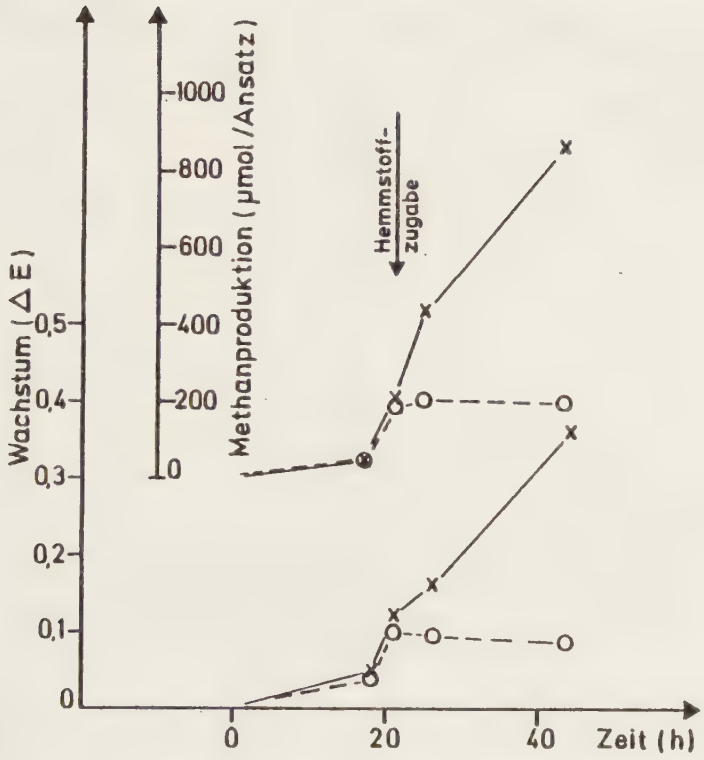


Abb. 35: Wirkung von Gramicidin bei Zugabe zu einer wachsenden Kultur von Mb. bryantii M.o.H.$_G$

(oben Methanproduktion, unten Wachstum; x Kontrolle; O 10mg Gramicidin/l)

### III. 3. 5. Wirkung der Hemmstoffe auf den ATP-Gehalt methanogener Zellen

Der Einfluß von Monensin, Lasalocid und 2,4 DNP auf die Methanproduktion und auf den ATP-Gehalt methanogener Zellen wurde sowohl bei Zugabe zu wachsenden Kulturen als auch bei Zugabe zu dichten Zellsuspensionen untersucht. Diese Versuche wurden wiederum mit Mb. bryantii M.o.H.$_G$ durchgeführt.

Monensin und Lasalocid bewirken nach Zugabe ein deutliches Absinken des intrazellulären ATP-Gehaltes, wobei die Wirkung von

Lasalocid bei gleicher Konzentration stärker ausgeprägt ist (Abb. 36; 38).

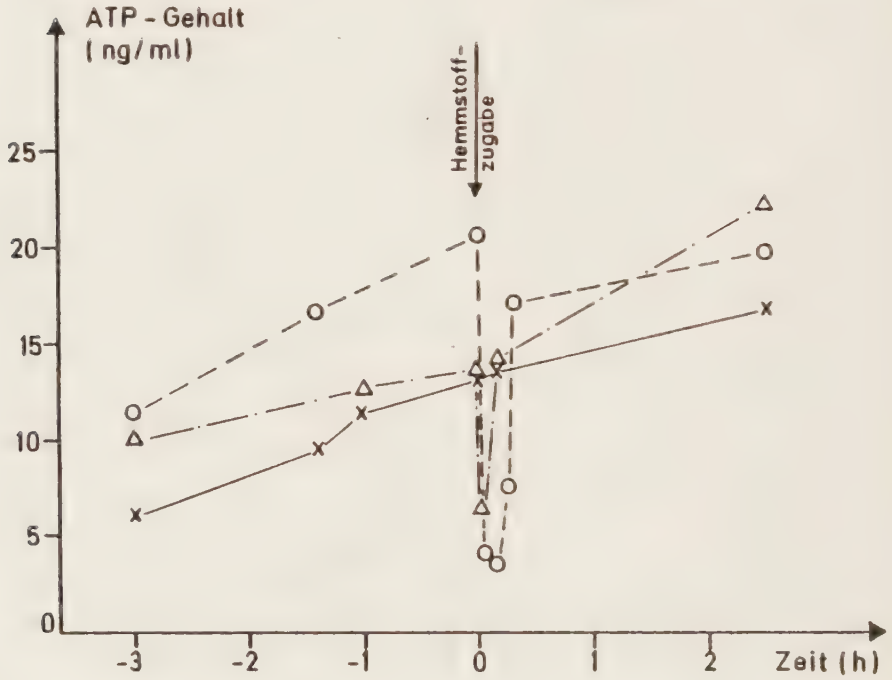


Abb. 36: Einfluß von Monensin und Lasalocid auf den intrazellulären ATP-Gehalt von Mb. bryantii $M.o.H._G$ bei Zugabe zu einer wachsenden Kultur
(Hemmstoffzugabe bei einer OD von ca. 0,1; x Kontrolle;
O 10mg Lasalocid/l; Δ 10mg Monensin/l)

Innerhalb kurzer Zeit (bei den Versuchen mit wachsenden Kulturen bei Monensin nach ca. 8 min, bei Lasalocid nach ca. 20 min) steigt der ATP-Gehalt jedoch wieder an. Bei den Versuchen mit dichten Zellsuspensionen wird eine Stunde nach Hemmstoffzugabe der ATP-Gehalt der unbehandelten Kontrolle sogar deutlich übertroffen (Abb. 38).

Die Methanproduktion wird wiederum nicht gehemmt, auch nicht innerhalb des Zeitraumes, in dem der ATP-Gehalt verringert ist, wie aus einem zusätzlichen Versuch hervorgeht (Abb. 39).

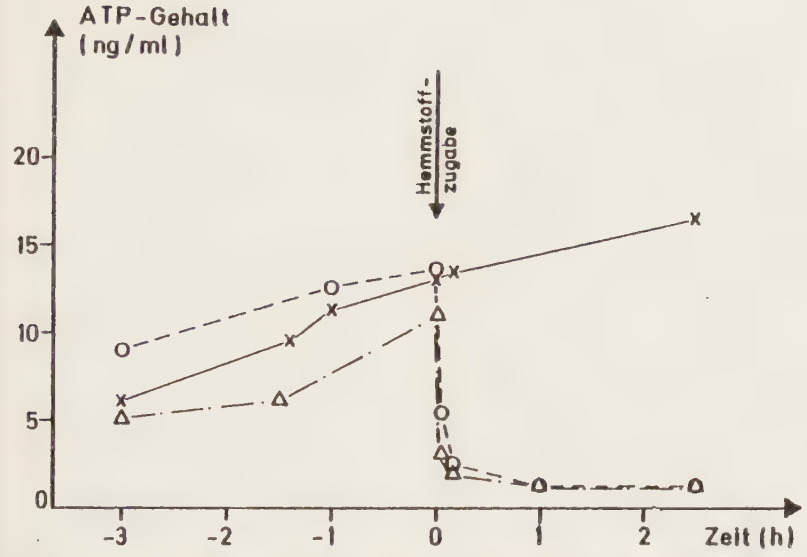


Abb. 37: Einfluß von 2,4 DNP auf den intrazellulären ATP-Gehalt von Mb. bryantii $M.o.H._G$ bei Zugabe zu einer wachsenden Kultur

(Hemmstoffzugabe bei einer OD von ca. 0,1; x Kontrolle; O 0,01mmol 2,4 DNP/l; Δ 0,1mmol 2,4 DNP/l)

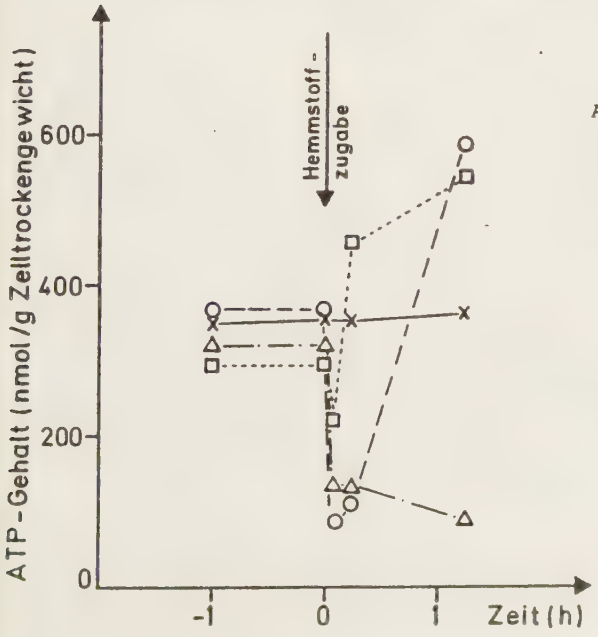


Abb. 38:Wirkung von Monensin, Lasalocid und 2,4 DNP auf den intrazellulären ATP-Gehalt von Mb. bryantii $M.o.H._G$ bei Zugabe zu einer dichten Zellsuspension

(Zelltrockengewicht ca.0,7g/l;
x Kontrolle
O 20mg Lasalocid/l
□ 20mg Monensin/l
Δ 0,1mmol 2,4 DNP/l)

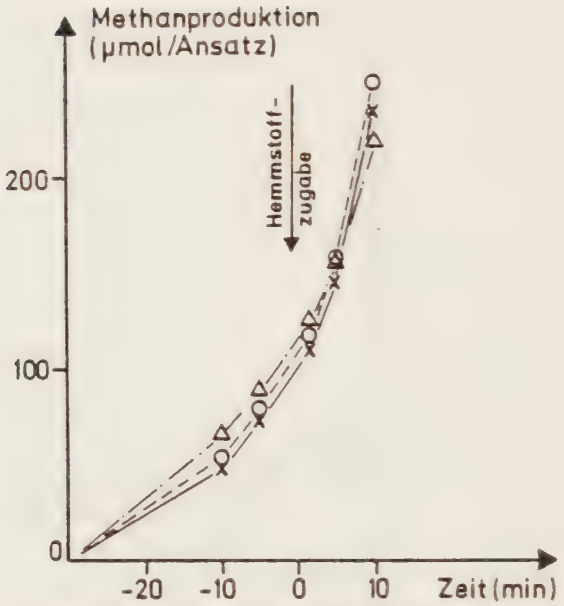


Abb. 39: Einfluß von Monensin und Lasalocid auf die Methanproduktion einer Zellsuspension von Mb. bryantii M.o.H.$_G$ unmittelbar nach Hemmstoffzugabe

(Zelltrockengewicht ca. 1mg/ml; x Kontrolle;
O 10mg Monensin/l; Δ 10mg Lasalocid/l)

2,4 DNP bewirkt ebenfalls ein rasches Absinken des ATP-Gehaltes in den Zellen. Im Gegensatz zur Wirkung von Monensin und Lasalocid dauert die Absenkung hier jedoch an und die Methanbildung ist wiederum gehemmt (Abb. 37; 38).

Durch Monensin und Lasalocid wird also vorübergehend die Methanbildung von der ATP-Bildung entkoppelt, während durch 2,4 DNP der ATP-Gehalt dauerhaft abgesenkt wird, bei gleichzeitiger Hemmung der Methanbildung. Das Zellwachstum ist unter der Einwirkung von Monensin und Lasalocid auch nach dem Wiedereinsetzen der ATP-Bildung gehemmt, wie die unter III. 3. 4. beschriebenen Versuche zeigten.

### III. 3. 6. Einfluß der Dichte der Zellsuspensionen auf die Methanbildungsrate

Es wurde geprüft, ob unter den für die Untersuchungen mit Zellsuspensionen gewählten Versuchsbedingungen ( ca. 1mg Zell-TG/ml) die Substratverfügbarkeit einen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Methanbildung ausübt. Hierzu wurden die Methanproduktionsraten in verschieden dichten Zellsuspensionen bestimmt.
In Abb. 40 sind die Ergebnisse dargestellt. Man erkennt, daß in der dichtesten der hier eingesetzten Suspensionen (1,1mgTG/ml) etwas weniger Methan, bezogen auf das Zelltrockengewicht, gebildet wird (0,43µmol $CH_4$/min x mgTG). In allen anderen Suspensionen liegen die Raten bei ca. 0,52µmol $CH_4$/min x mgTG. Bei der Interpretation der beschriebenen Ergebnisse mit Zellsuspensionen ist also zu berücksichtigen, daß die Methanbildung jeweils unter leichter Substratunterversorgung ablief.

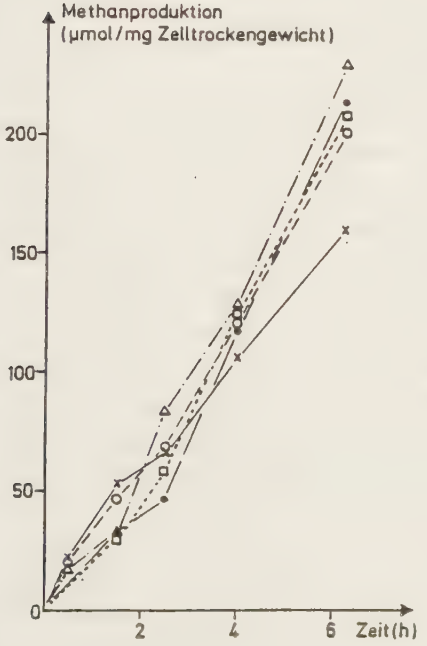


Abb. 40: Einfluß der Dichte einer Zellsuspension von Mb. bryantii M.o.H.$_G$ auf die Methanbildungsrate

( × 1,1mgTG/ml; ○ 0,33mgTG/ml; △ 0,11 mgTG/ml; □ 0,08 mgTG/ml; ● 0,04mgTG/ml)

## III. 4. Diskussion

### III. 4. 1. Die Wirkungen von Monensin und Lasalocid auf die Methangärung

Das Wachstum von Reinkulturen methanogener Bakterien wird durch Konzentrationen von Monensin oder Lasalocid, wie sie im Pansen hemmstoffgefütterter Masttiere oder in Biogasanlagen, die mit hemmstoffhaltiger Gülle beschickt werden, theoretisch auftreten können, deutlich gehemmt. Es ist also denkbar, daß auch in diesen komplexen Ökosystemen eine direkte Hemmung der methanogenen Flora durch diese Hemmstoffe eine Rolle spielen kann.

Dementsprechend könnte auch die bei der Verabreichung von Monensin an Mastrinder beobachtete Abnahme der Methanproduktion im Pansen (Van Nevel und Demeyer, 1977) möglicherweise nicht nur eine Folge der Hemmung der $H_2$- und Acetat-bildenden Bakterien sein und damit auf einer Substratverknappung für methanogene Organismen beruhen, wie von Chen und Wolin (1979) vermutet wurde, sondern sie könnte ebenfalls auf eine direkte Hemmung der methanogenen Mikroorganismen zurückgehen.

Die Annahme einer direkten Hemmung der methanogenen Flora könnte auch die bei der Vergärung von Klärschlamm durch Monensin bewirkten Effekte, wie Abnahme der Anzahl methanogener Keime und der Methanproduktion und Anstieg von Essig- und Propionsäure (siehe Teil II), erklären. Allerdings können diese Effekte, wie in Teil II bereits ausführlich diskutiert, auch durch die Annahme erklärt werden, daß Monensin primär eine Entkopplung des Energiestoffwechsels der säurebildenden Mikroorganismen bewirkt. Hierdurch würde eine verstärkte Säurebildung bei verringertem Zellwachstum einsetzen, was zu einer Erniedrigung des pH-Wertes und damit zur Hemmung der methanogenen Mikroorganismen führen würde.

Obwohl Monensin eine ausgeprägte Hemmung des Wachstums methanogener Bakterien bewirkt, ist eine Inaktivierung des Hemmstoffes durch Reinkulturen möglich, wie die Abnahme der Monensinaktivität während des Wachstums von Mbr. smithii PS zeigte. Dies kann bei der Anpassung von Fermentationsprozessen an Monensin, wie sie in dieser Arbeit für die Klärschlammvergärung (Teil II) und von Varel und Hashimoto (1982) für die Vergärung von Rindergülle beschrieben wurden, von Bedeutung sein.
Allerdings könnte die bei diesen Versuchen beobachtete Anpassung an Monensin aufgrund der langen Anpassungszeiten auch auf Selektion einer resistenten Mikroflora beruhen. Bei den Versuchen mit Mbr. smithii PS in Monensin-haltigen Nährböden wurde jedoch keine derartige Selektion beobachtet.

Im Gegensatz zu Monensin bewirkt Lasalocid in Konzentrationen, die das Wachstum methanogener Reinkulturen bereits völlig unterbinden, bei der Klärschlammvergärung keine Hemmung der Fermentation, sondern im Gegenteil eine leicht erhöhte Methanproduktion trotz geringfügig verringerter Anzahl methanogener Keime (siehe Teil II). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Varel und Hashimoto (1982) überein, die fanden, daß Lasalocid auch bei der Vergärung von Rindergülle keine Hemmung bewirkt.

Die Versuche mit methanogenen Reinkulturen sprechen dafür, daß die vermehrte Gasproduktion unter dem Einfluß von Lasalocid wahrscheinlich auf eine Entkopplung von Zellwachstum und Methanbildung durch Lasalocid zurückgeht. Da jedoch auch hohe Konzentrationen, die das Wachstum von Reinkulturen methanogener Bakterien bereits deutlich hemmen, keine Schädigung des komplexen Gärprozesses in den Klärschlammfermentern bewirken, muß angenommen werden, daß hier eine Inaktivierung des Hemmstoffes erfolgt. Hierfür spricht auch die nur einen Tag anhaltende Wirkung von Lasalocid bei einmaliger Zugabe zur Fermentation und die Tatsache, daß beim Wachstum einer Reinkultur von Mbr. smithii PS tatsächlich eine leichte Inaktivierung des Hemmstoffes beobachtet werden konnte.

III. 4. 2. Wirkungsmechanismus von Monensin und Lasalocid.

Wie das rasche Austreten von Kalium aus Methanbakterien in K-armem Medium zeigte, üben Monensin und Lasalocid auch an den Membranen der Methanbakterien die von Eubakterien her bekannten Wirkungen aus, d.h. sie bedingen eine Erhöhung der Membrandurchlässigkeit für Kationen.
Dieser Befund stimmt gut mit den Ergebnissen von Jarrel und Sprott (1983) überein, die fanden, daß der intrazelluläre K-Gehalt von Mb. bryantii M.o.H.$_G$ durch Monensin (14mg/l) erniedrigt wird. Allerdings war bei diesen Versuchen 15 min nach Hemmstoffzugabe, dem einzigen Zeitpunkt, zu dem die Wirkungen der Hemmstoffe bestimmt wurden, ein Konzentrationsgradient von ca. 40:1 (innen:außen) gefunden worden, während bei den eigenen Untersuchungen nach derselben Einwirkzeit praktisch Konzentrationsausgleich stattgefunden hatte. Dieser Unterschied dürfte durch die verschiedenen Kalium-Konzentrationen in den Suspensionsmedien bedingt sein, die bei Jarrell und Sprott (5,7mmol/l) nahezu 30mal höher waren als in dieser Arbeit (0,2mmol/l). Die eingesetzten Hemmstoffkonzentrationen wichen nicht stark voneinander ab (10 bzw. 14mg/l) und sollten daher nicht für die unterschiedlichen Wirkungen verantwortlich sein.

Aufgrund der höheren Affinität von Lasalocid für Kalium (Reed, 1979) ist es nicht verwunderlich, daß es einen rascheren und auch etwas weiter gehenden Austritt von Kalium aus den Zellen bewirkt als Monensin. Da Methanbakterien an ihren Zellmembranen einen ausgeprägten Kaliumgradienten aufbauen (Sprott und Jarrell, 1981), könnte die bei gleicher Konzentration stärkere Hemmwirkung von Lasalocid gegen Reinkulturen methanogener Organismen in der höheren Affinität zu Kalium begründet sein.

Trotz des raschen K-Austritts bei Hemmstoffkonzentrationen von 10mg/l wurde die Methanbildung in den Versuchen mit dichten, ruhenden Zellsuspensionen von keinem der beiden Wirkstoffe gehemmt. Auch bei Zugabe zu wachsenden Kulturen methanogener

Mikroorganismen wird durch Monensin- oder Lasalocid-Konzentrationen von 10mg/l nur das Zellwachstum, nicht jedoch die Methanbildung unterbunden. Die Unwirksamkeit von Monensin auf die Methanbildung im neutralen pH-Bereich wurde auch von Jarrell und Sprott (1983) beobachtet.
Diese Effekte entsprechen formal einer Entkopplerwirkung, da die energieliefernden Reaktionen (Methanbildung) zwar ablaufen, die dabei freiwerdende Energie aber offensichtlich nicht mehr für das Wachstum genutzt werden kann.
Im Gegensatz hierzu hemmt die "klassische" Entkopplersubstanz 2,4 DNP in Konzentrationen, die das Zellwachstum beeinträchtigen, jeweils auch die Methanbildung, zeigt also in dieser Hinsicht keine entkoppelnde Wirkung. Dies entspricht auch den Befunden anderer Autoren, die für Entkopplersubstanzen wie 2,4 DNP, CCCP und PCP (Pentachlorphenol) bei Methanbakterien eine Hemmung sowohl der ATP-Bildung bzw. des Wachstums als auch der Methanproduktion fanden (Roberton und Wolfe, 1970; Mountfort, 1978; Sauer et al., 1979).
Diese Befunde führten nun zu der Frage, ob durch Monensin und Lasalocid die ATP-Synthese direkt betroffen wird, d.h. ob tatsächlich eine Entkopplung von Methanbildung und Energiegewinn stattfindet oder ob die beobachtete Wachstumshemmung auf andere Effekte der Hemmstoffe zurückzuführen ist.

Es zeigte sich, daß Monensin und Lasalocid nur vorübergehend eine Absenkung des intrazellulären ATP-Gehaltes bei verminderter Methanproduktion bewirken, während der Einsatz von 2,4 DNP zu einer permanenten Absenkung des ATP-Gehaltes führt, allerdings bei gleichzeitig gehemmter Methanproduktion.
Auch Jarrell und Sprott (1983) beschrieben eine Verringerung des intrazellulären ATP-Gehaltes von Mb. bryantii $M.o.H._G$ durch Monensin um ca 50% nach 15min Einwirkzeit. Da dies, wie bereits oben angesprochen, aber der einzige Meßzeitpunkt bei diesen Versuchen war, ist es möglich, daß die Absenkung des ATP-Gehaltes auch dort nur vorübergehend war und dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen kurzzeitigen Absinken von ATP entspricht.

Unter Berücksichtigung der Wirkungsweise der verschiedenen Hemmstoffe zeichnet sich die Regel ab, daß die elektroneutralen ionophoren Hemmstoffe Monensin und Lasalocid, die zwar Konzentrationsgradienten, nicht jedoch Membranpotentiale beeinflussen, keine dauerhafte Hemmung, sondern nur eine kurzzeitige Störung der ATP-Synthese bewirken. Im Gegensatz hierzu führt 2,4 DNP, das elektrogenen Ionentransport hervorruft und daher auch Ladungstrennungen an Membranen zerstören kann, zu einer dauerhaften Hemmung der ATP-Synthese.
Die Hemmung der Methanbildung durch 2,4 DNP und Gramicidin ist vermutlich ein sekundärer Effekt, nämlich die Folge des Fehlens von ATP, da für irgendeinen Schritt der Methanbildung ATP nötig zu sein scheint (Mc Bride und Wolfe, 1971).

Die unterschiedliche Wirkung der beiden Hemmstoffklassen kann als Hinweis dafür angesehen werden, daß die treibende Kraft zur ATP-Bildung bei Mb. bryantii M.o.H.$_G$ eher in einem Membranpotential als in einem Konzentrationsgradienten besteht. Dies stimmt gut mit den Befunden von Jarrell und Sprott (1981 und 1983) überein, die an Membranen von Mb. thermoautotrophicum, Msp. hungatei und Mb. bryantii M.o.H.$_G$ keinen pH-Gradienten, wohl aber ein deutliches Membranpotential beobachteten. Dieses wird durch den von Monensin und Lasalocid verursachten Kationentransport zwar gestört, worauf das kurzzeitige Absinken von ATP bei Einwirkung dieser Hemmstoffe hindeutet, aber nach Einstellung eines neuen Gleichgewichtes kann es wieder aufgebaut werden und ATP-Bildung ermöglichen. Für die Möglichkeit, daß Monensin, entgegen der erwarteten Wirkung als elektroneutraler Antiporter, vorübergehend auch das Membranpotential beeinflussen kann, spricht auch der Befund von Jarrell und Sprott (1983), die eine signifikante Erhöhung des Membranpotentials von Mb. bryantii M.o.H.$_G$ 15min nach Monensinzugabe beobachteten.

Die langfristige Wachstumshemmung methanogener Bakterien durch Monensin und Lasalocid wird nach den vorliegenden Ergebnissen nicht durch das Fehlen von ATP herbeigeführt, sondern muß durch andere Wirkungen bedingt sein, wie z.B. Veränderung von Ionenkonzentrationen in der Zelle und damit verbundener Störung enzymatischer Prozesse.

## IV. ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluß von Fütterungsantibiotika, synthetischen Fütterungszusätzen und Stalldesinfektionsmitteln auf den Gesamtprozeß der Methangärung in Standversuchen und bei einigen Wirkstoffen auch in semikontinuierlich betriebenen Laborfermentern untersucht. Als Substrat diente kommunaler Klärschlamm.

In Konzentrationen, die bei vorschriftsmäßiger Anwendung dieser Mittel zumindest theoretisch in Faulräumen erreicht werden können, zeigen in den Standversuchen folgende Stoffe bzw. Präparate eine Hemmwirkung:

Antibiotika: Bacitracin, Monensin, Spiramycin, Tylosin, Virginiamycin.
Synthetische Chemotherapeutica: Arsanilsäure, Olaquindox.
Desinfektionsmittel: Dekaseptol deutlich,
Orbivet, Incidin 3, Thegodor 73 schwach.

Eine leichte Steigerung der Methanausbeute wird bei Zugabe von Lasalocid beobachtet.

Die ionophoren Hemmstoffe Monensin und Lasalocid wurden auch in semikontinuierlich betriebenen Laborfermentern untersucht. Hier bewirkt Monensin einen raschen Anstieg von Essig- und Propionsäure im Gäransatz und eine Verminderung der Anzahl methanogener Keime und der Methanproduktion. Allerdings führen Stoßbelastung bis zu 3mg Monensin/l oder ständige Zufuhr von 1mg Monensin/l nicht zum völligen Zusammenbruch der Fermentation. Dies zeigt, ebenso wie Standversuche mit Monensin-vorbelastetem Fermentationsgut, daß eine Anpassung an den Hemmstoff möglich ist.

Der Natrium-Gehalt im Fermenter hat keinen Einfluß auf die beschriebenen Wirkungen von Monensin.

Lasalocid bewirkt bei Stoßbelastung eine vorrübergehende Erhöhung der Gasproduktion. Bei ständiger Zufuhr ist die Gasproduktion dauerhaft um ca. 10-15% erhöht. Die Anzahl methanogener Keime nimmt unter dem Einfluß von Lasalocid leicht ab, der Gehalt an flüchtigen Säuren bleibt unbeeinflußt.

Der Methangehalt des gebildeten Biogases wird durch keinen der untersuchten Hemmstoffe signifikant beeinflußt; er liegt bei allen Experimenten zwischen 72 und 78%.

Im zweiten Teil wurden die Wirkungen von Monensin und Lasalocid auf Reinkulturen methanogener Bakterien untersucht. Beide Wirkstoffe hemmen das Wachstum methanogener Mikroorganismen deutlich, wobei Lasalocid in gleicher Konzentration eine stärkere Wirkung als Monensin besitzt. Von den untersuchten Methanbakterien erweist sich Mbr. smithii PS als am wenigsten empfindlich gegenüber beiden Hemmstoffen; dies scheint auf der Fähigkeit dieses Keimes zu beruhen, Monensin und in geringerem Maße auch Lasalocid zu inaktivieren.
Beide Hemmstoffe bewirken raschen Austritt von Kalium aus methanogenen Bakterien. Die Methanproduktion wird hierdurch jedoch nicht beeinflußt. Bei Zugabe der Hemmstoffe zu wachsenden Kulturen wird zwar das Wachstum der Zellen, nicht jedoch die Methanbildung gehemmt. Dies kann formal als Entkopplerwirkung angesehen werden und eröffnet eine Erklärungsmöglichkeit für die im ersten Haupttail beschriebenen Wirkungen von Lasalocid auf die Methangärung.

Im Gegensatz zu 2,4 DNP, das eine dauerhafte Verringerung des ATP-Gehaltes methanogener Zellen bewirkt, rufen Monensin und Lasalocid nur ein kurzzeitiges Absinken des ATP-Gehaltes hervor. Dies zeigt, daß diese Hemmstoffe nicht tatsächlich die ATP-Synthese von der Methanbildung entkoppeln und daß dementsprechend die beobachtete Wachstumshemmung nicht auf zu geringer Energiebereitstellung beruht.

Die Unterschiede zwischen den ionophoren Hemmstoffen und 2,4 DNP in ihrer Wirkung auf den ATP-Gehalt methanogener Zellen können als Hinweis dafür angesehen werden, daß bei der Kopplung der ATP-Synthese an den anaeroben Elektronentransport methanogener Bakterien die Aufrechterhaltung von Potentialdifferenzen an Membranen von Bedeutung ist, während Konzentrationsgradienten keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen.

## V. LITERATURVERZEICHNIS

Balch, W.E., Schoberth, S., Tanner, R.S., Wolfe, R.S.: Acetobacterium, a new genus of hydrogen oxidizing, carbondioxide reducing anaerobic bacteria. Int. J. Sys. Bacteriol. 27, 355-361 (1977).

Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., Wolfe, R.S.: Methanogens: Reevaluation of a unique biological group. Microbiol. Rev. 43, 260-296 (1979).

Barnes, E.M., Ingram, M.: The effect of redox potential on the grown Clostridium welchii strain isolated from horse muscle. J. Appl. Bact. 19, 177-178 (1956).

Beutin, L.: Antibiotika und chemische Wirkstoffe in der Tierernährung. BIUZ 11, 129-134 (1981).

Boone, D.R., Bryant, M.P.: Propionate-degrading bacterium, Syntrophobacter wolinii sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. Appl. Environ. Microbiol. 40, 626-632 (1980).

Braun, M., Schoberth, S., Gottschalk, G.: Enumeration of bacteria forming acetate from $H_2$ and $CO_2$ in anaerobic habitats. Arch. Microbiol. 120, 201-204 (1979).

Bryant, M.P.: Microbiology of the rumen. In: Physiology of domestic animals (M.J. Swenson, Ed.), 287-304, Cornell Univ. Press, New York, 1977.

Buckel, W., Semmler, R.: A biotin-dependent sodium pump: glutaconyl-CoA decarboxylase from Acidaminococcus fermentans. FEBS Lett. 148, 35-38 (1982).

Bundesministerium des Inneren (Ed.): Was Sie schon immer über Abfall und Umwelt wissen wollten. Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart, 1981.

Burgstaller, G.: Praktische Schweinefütterung. Tierzuchtbücherei der Bayer. Landesanstalt f. Tierzucht, Grub, 1980.

Chen, M., Wolin, M.J.: Effect of Monensin and Lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 38, 72-77 (1979).

Cocito, C.: Antibiotics of the Virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. Microbiol. Rev. 43, 145-198 (1979).

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG): Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung. Deutsches Tierärzteblatt 1, 10-13 (1979).

Dimroth, P.: A new sodium-transport system energized by the decarboxylation of oxaloacetate. FEBS Lett. 122, 234-236 (1980).

Doddema, H.J., Hutten, T.J., Van der Drift, C., Vogels, G.D.: ATP-hydrolysis and synthesis by the membrane-bound ATP synthetase complex of Methanobacterium thermoautotrophicum. J. Bacteriol. 136, 19-23 (1978).

Doddema, H.J., Van der Drift, C., Vogels, G.D., Veenhuis, M.: Chemiosmotic coupling in Methanobacterium thermoautotrophicum: Hydrogen-dependent adenosine 5'-triphosphate synthesis by subcellular particles. J. Bacteriol. 140, 1081-1089 (1979).

Donoho, A., Manthey, J., Occolowitz, J., Zornes, L.: Metabolism of Monensin in the steer and rat. J. Agric. Food Chem. 26, 1090-1095 (1978).

Drews, J.: Grundlagen der Chemotherapie. Springer-Verlag, Wien - New York, 1979.

Elanco: Produktinformation Monensin. Homburg/Saar, 1979.

Enigk, K., Hilbrich, P.: Die Stalldesinfektion bei Parasitosen. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 75, 488-492 (1968).

Franklin, T.J., Snow, G.A.: Biochemistry of antimicrobial action. Verlag Chapman and Hall, London, 1975.

Fischer Weltalmanach 1983. Fischer Taschenbuchverlag, Stuttgart, 1982.

Hammes, W.P., Winter, J., Kandler, O.: The sensitivity of the pseudomurein-containing genus Methanobacterium to inhibitors of murein synthesis. Arch. Microbiol. 123, 275-279 (1979).

Henderson, C., Stewart, C.S., Nekrep, F.V.: The effect of Monensin on pure and mixed cultures of rumen bacteria. J. Appl. Bacteriol. 51, 159-169 (1981).

Herbert, D., Phipps, P.J., Strange, R.E.: Chemical analysis of microbial cells. In: Methods in Microbiology 5B, (Worris, J.R., Ribbons, D.W., Eds.), Academic Press, New York/London, 1971.

Hilpert, R., Winter, J., Hammes, W., Kandler, O.: The sensitivity of Archaebacteria to antibiotics. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C2, 11-20 (1981).

Hilpert, W., Dimroth, P.: Conversion of the chemical energy of methylmalonyl-CoA decarboxylation into a $Na^+$gradient. Nature 296, 584-585 (1982).

Hilpert, R., Winter, J., Kandler, O.: Fütterungszusätze und Desinfektionsmittel als Störfaktoren bei der anaeroben Faulung landwirtschaftlicher Abfälle. Münchener Beitr. Abwasser-, Fischerei- u. Flußbiol. 36, 161-176 (1983).

Hoechst AG: Produktinformation Flavophospholipol. Frankfurt, 1980.

Hoffmann-La Roche: Produktinformation Avatec. Basel, Schweiz, 1980.

Huber, G.: Moenomycin and related phosphorus-containing antibiotics. In: Antibiotics V/1 (Hahn, F.E., Ed.), Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1979.

Huser, B.A., Wuhrmann, K., Zehnder, A.J.B.: Methanothrix soehngenii gen. nov. sp. nov., a new acetotrophic non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. Arch. Microbiol. 132, 1-9 (1982).

Jarrell, K.F., Sprott, G.D.: The transmembrane electrical potential and intracellular pH in methanogenic bacteria. Can. J. Microbiol. 27, 720-728 (1981).

Jarrell, K.F., Sprott, G.D.: The effects of Ionophores and metabolic inhibitors on methanogenesis and energy-related properties of Methanobacterium bryantii. Arch. Biochem. Biophys. 225, 33-41 (1983).

Kandler, O.: Zellwandstrukturen bei Methanbakterien. Naturwissenschaften 66, 96-105 (1979).

Kandler, O.: Archaebakterien und Phylogenie der Organismen. Naturwissenschaften 68, 183-192 (1981).

Kandler, O., Temper, U., Steiner, A., Winter, J.: Efficiency and stability of methane fermentation of wastes at mesophilic and thermophilic temperatures. Proceedings of the Conference on Recent Advances in Biotechnology during CHEMTECH + ORT'83, New Delhi, 1983.

Karrer, P.: Lehrbuch der Organischen Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1963.

Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z., Kurytowicz, W.: Antibiotics; origin, nature and properties. ASM, Washington DC, USA, 1978.

Kuschinsky, G., Lüllmann, H.: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie. 4. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1970.

Loll, U.: Stand der Klärschlammbehandlung in der Bundesrepublik Deutschland. Technik-Forschung-Praxis. In: Klärschlamm; Stand und Aussichten. (Bundesministerium f. Forschung und Technologie, Ed.), 11-21, 1978.

Mackie, R.I., Bryant, M.P.: Metabolic activity of fatty acid-oxidizing bacteria and the contribution of acetate, propionate, butyrate, and $CO_2$ to methanogenesis in cattle waste at 40 and 60°C. Appl. Environ. Microbiol. 41, 1363-1373 (1981).

Mah, R.A., Ward, D.M., Baresi, L., Glass, T.L.: Biogenesis of methane. Ann. Rev. Microbiol. 31, 309-341 (1977).

Märkl, H.: Mikrobielle Methangewinnung. Fortschritte der Verfahrenstechnik 18, 549-566 (1980).

McBride, B.C., Wolfe, R.S.: A new coenzyme of methyl transfer, coenzyme M. Biochemistry 10, 2317-2324 (1971).

McInerney, M.J., Bryant, M.P., Hespell, R.B., Costerton, J.W.: Syntrophomonas wolfei gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 41, 1029-1039 (1981).

Metzner, P.: Algenbekämpfung im Schwimmbad. Archiv des Badewesens 5, 262-263 (1977).

Mitchell, P.: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature 191, 144-148 (1961).

Mountfort, D.O.: Evidence for ATP synthesis driven by a proton gradient in Methanosarcina barkeri. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1346-1351 (1978).

Perski, H.J., Schönheit, P., Thauer, R.K.: Sodium dependence of methane formation in methanogenic bacteria. FEBS Lett. 143, 323-326 (1982).

Reed, W.B.: Ionophores. In: Methods in Enzymology, LV (Grossman, L., Moldave, K., Eds.) 435-454, Academic Press, New York/ London, 1979.

Reintges, H., Schon, P., Schrödter, E., Willing, H.G.: Jahrbuch für Bergbau, Energie, Mineralöl und Chemie. Essen, 1979.

Roberton, A.M., Wolfe, R.S.: Adenosine triphosphate pools in Methanobacterium. J. Bacteriol. 102, 43-51 (1970).

Roediger, H.: Die anaerobe alkalische Schlammfaulung. Schriftenreihe GWF-Wasser/Abwasser 1, 3.Aufl., Verlag R. Oldenbourg, München/Wien, 1967.

Sahm, H.: Pflanzliche Rückstände als Substrate in der Biotechnologie. Forum Mikrobiologie 4, 177-182 (1979).

Sauer, F.D., Erfle, J.D., Mahadevan, S.: Methane synthesis without the addition of adenosine triphosphate by cell membranes isolated from Methanobacterium ruminantium. Biochem. J. 178, 165-172 (1979).

Schefer, W.; Hemmung der anaeroben Gärung von Klärschlamm durch Abwasserinhaltstoffe. Z. Wasser Abwasser Forsch. 14, 69-71 (1981).

Schoberth, S.: Mikrobielle Methanisierung von Klärschlamm. Chemie-Biologie-Potential. In: Klärschlamm; Stand und Aussichten. (Bundesministerium f. Forschung und Technologie, Ed.), 87-135, 1978.

Sharak Genthner, B.R., Davis, C.L., Bryant, M.P.: Features of rumen and sewage sludge strains of Eubacterium limosum, a methanol- and $H_2$-$CO_2$-utilizing species. Appl. Environ. Microbiol. 42, 12-19 (1981).

Siewert, G., Strominger, J.L.: Bacitracin: An inhibitor of the dephosphorylation of lipid pyrophosphate, an intermediate in biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 767-773 (1967).

Soutschek, E.: Mikrobiologische Untersuchungen zur thermophilen Methangärung. Diplomarbeit Universität München, 1982.

Sprott, G.D., Jarrell, K.F.: $K^+$, $Na^+$, and $Mg^{2+}$content and permeability of Methanospirillum hungatei and Methanobacterium thermoautotrophicum. Can. J. Microbiol. 27, 444-451 (1981).

Stanier, G., Davies, A.: Effects of the antibiotic Monensin and an inhibitor of methanogenesis on in vitro continuous rumen fermentations. Br. J. Nutr. 45, 567-578 (1981).

Steiner, A., Kandler, O.: Anaerober Abbau von Schlachthofabfällen. Münchener Beitr. Abwasser-, Fischerei- u. Flußbiol. 36, 193-212 (1983).

Strauch, D.: Stand und Tendenzen hygienischer Beurteilung der Aufbereitung und landwirtschaftlichen Verwertung von Reststoffen aus der tierischen Produktion und dem kommunalen Bereich. Zbl. Vet. Med. B 29, 733-763 (1982).

Suter, W., Rosselet, A., Knüsel, F.: Mode of action of Quindoxin and substituted Quinoxaline-di-N-oxides on Escherichia coli. Antimicr. Agents Chemoth. 13, 770-783 (1978).

Temper U., Steiner, A., Winter, J., Kandler, O.: Thermophile Methangärung - Stand und Aussichten. In: Mikrobiologische und verfahrenstechnische Optimierung biologischer Abbauprozesse. (Bundesministerium f. Forschung und Technologie, Ed.), 19-37, 1982.

Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K.: Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bact. Rev. 41, 100-180 (1977).

Thauer, R.K., Fuchs, G.: Methanogene Bakterien. Ungewöhnliche Zellkomponenten und Stoffwechselwege in einer Bakteriengruppe mit phylogenetischer Sonderstellung. Naturwissenschaften 66, 89-94 (1979).

Tornabene, T.G., Wolfe, R.S., Balch, W.E., Holzer, G., Fox, G.E., Oro', J.: Phytanyl-glycerol ethers and squalenes in the archaebacterium Methanobacterium thermoautotrophicum. J. Mol. Evol. 11, 259-266 (1978).

Tornabene, T.G., Langworthy, T.A., Holzer, G., Oro', J.: Squalenes, phytanes and other isoprenoids as major neutral lipids of methanogenic and thermoacidiphilic "archaebacteria". J. Mol. Evol. 13, 73-83 (1979).

Ueki, A., Miyagawa, E., Minato, H., Azuma, R., Suto, T.: Enumeration and isolation of anaerobic bacteria in sewage digestor fluids. J. Gen. Appl. Microbiol. 24, 317-332 (1978).

Van Nevel, C.J., Demeyer, D.I.: Effect of Monensin on rumen metabolism in vitro. App. Environ. Microbiol. 34, 251-257 (1977).

Varel, V.H., Hashimoto, A.G.: Effect of dietary Monensin or Chlortetracycline on methane production from cattle waste. Appl. Environ. Microbiol. 41, 29-34 (1981).

Varel, V.H., Hashimoto, A.G.: Methane production by fermentor cultures acclimated to waste from cattle fed Monensin, Lasalocid, Salinomycin, or Avoparcin. Appl. Environ. Microbiol. 44, 1415-1420 (1982).

Vazquez, D.: The Macrolide antibiotics. In: Antibiotics III. Mechanism of action of antimicrobial and antitumor agents, (Corcoran, J.W., Hahn, F.E., Eds.), 459-479, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York, 1975.

Wenner, H.L.: Die Landwirtschaft. Bd. 3. Verlag Landtechnik und Bauwesen, München, 1973.

Winter, J., Wiegel, J.: Der anaerobe Abbau von Cellulose zu Methan. Forum Mikrobiologie 4, 202-208 (1981).

Woese, C.R., Magrum, L.J., Fox, G.E.: Archaebacteria. J. Mol. Evol. 11, 245-252 (1978).

Wolf, P., Nordmann, W.: Eine Feld-Methode für die Messung des CSB von Abwasser. Korrespondenz Abwasser 24, 277-279 (1977).

Wolfe, R.S.: Microbial biochemistry of methane - a study in contrasts. Part I.: Methanogenesis. Int. Rev. Biochem. 21, 267-299 (1979).

Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S.: Formation of methane by bacterial extracts. J. Biol. Chem. 238, 2882-2886 (1963).

Wolin, M.J.: Fermentation in the rumen and human large intestine. Science 213, 1463-1468 (1981).

Würch, H.H.: Zur betriebstechnischen Einordnung von Biogasanlagen. Grundl. Landtechnik 31, 55-60 (1981).

Yahagi, T., Nagao, M., Hara, K., Matsushima, T., Sugimura, T., Bryan, G.T.: Relationships between the carcinogenic and mutagenic or DNA-modifying effects of Nitrofuran derivatives, including 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamide, a food additive. Cancer Res. 34, 2266-2273 (1974).

Zeikus, J.G.: The biology of methanogenic bacteria. Bact. Rev. 41, 514-541 (1977).

## VI. ANHANG

Berechnung der maximalen theoretisch erreichbaren Hemmstoffkonzentrationen im Faulraum

A: Berechnung der maximalen theoretisch erreichbaren Hemmstoffkonzentration[1] im Faulraum
( Antibiotika und synthetische Chemotherapeutica )

| Hemmstoff | $C_{max}$ im Trockenfutter[2] (mg/kg) | Dosis pro Tier und Tag[3] (mg) | Dosis pro GV und Tag[4] (mg) | Gülleanfall pro GV und Tag (l) | $C_{max}$ in der Gülle (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|
| Bacitracin | 50 | 115 | 1150 | 40 | 29 |
| Flavomycin (Schweinemast) | 20 | 46 | 460 | 40 | 11 |
| Flavomycin (Rindermast) | 20 | 40 | 80 | 50 | 1,6 |
| Lasalocid[5] | - | - | - | - | 6 |
| Monensin | 100 | 200 | 400 | 50 | 8 |
| Spiramycin | 50 | 115 | 1150 | 40 | 29 |
| Tylosin | 40 | 92 | 920 | 40 | 23 |
| Virginiamycin | 50 | 115 | 1150 | 40 | 29 |
| Arsanilsäure | 250 | 575 | 5750 | 40 | 144 |
| Furazolidon | 250 | 575 | 5750 | 40 | 144 |
| Sulfamethazin | 250 | 575 | 5750 | 40 | 144 |
| Olaquindox | 100 | 230 | 2300 | 40 | 58 |

Erläuterungen:

1) Für alle Wirkstoffe wurde angenommen, daß im Masttier keinerlei Abbau oder Inaktivierung auftritt.

2) Angaben in dieser Spalte für Bacitracin, Flavomycin (Schweinemast), Olaquindox, Spiramycin, Tylosin und Virginiamycin aus "Praktische Schweinefütterung" von G. Burgsteller, Bayer. Landesanstalt f. Tierzucht, Grub, 1980.
Angaben für Monensin und Flavomycin (Rindermast) von Dr. Bastian, BAYWA AG, München.
Angaben für Arsanilsäure, Furazolidon und Sulfamethazin aus der Produktinformation ANIMEDICA S-2 und S-3, Fa. Animedica GmbH, Stuttgart, bei Anwendung in der Therapie.
Bei gleichzeitiger Gabe beider Präparate erhöhen sich die Werte für Arsanilsäure und Furazolidon bis zu einer Endkonzentration in der Gülle von ca. 250 mg/l.

3) Berechnungsgrundlagen: a) Schweinemast: Bei 20kg Lebendgewicht 1,1kg Trockenfutter/Tier und Tag
" 50kg " 2,3kg " "
" 100kg " 3,1kg " "
(Angaben aus "Grundlagen zur Futterberechnung für Schweine", Schriftenreihe der Bayer. Landesanstalt f. Tierzucht, Grub, 1981)
b) Rindermast: Gewicht der Masttiere zwischen 150 und 600kg Trockenfuttergabe ca. 2kg/Tier und Tag
(Angaben von Prof. Dr. Giesecke, Inst. f. Vet.-Med., Universität München)

4) Bei den in dieser Spalte angegebenen Werten wurde für die Schweinemast ein Schwein von 50 kg Lebendgewicht mit einer täglichen Trockenfutteraufnahme von 2,3kg zugrunde gelegt. Eine GV (Großvieheinheit) = 500kg, daher sind die Werte der vorhergehenden Spalte mit 10 zu multiplizieren. Für die Rindermast wurde ein Tier von 250kg mit einer Trockenfutteraufnahme von 2kg/Tag angenommen; daher müssen die Werte der vorhergehenden Spalte mit 2 multipliziert werden.

5) Angabe aus der Produktinformation AVATEC (Fa. Hoffmann-La Roche, 1980) für Hühnermist.

B: Berechnung der maximalen theoretisch erreichbaren Hemmstoffkonzentration[1] im Faulraum (Stalldesinfektionsmittel)

| Präparat | Konzentration der Gebrauchslösung | Verbrauch (Gebrauchslösung/$m^2$ Stallfläche) | Konzentration[2] des Präparates (Stammlösung) in der Gülle | Konzentration[3] des Präparates (Stammlösung) im Faulraum |
|---|---|---|---|---|
| Dekaseptol | bis 6% | bis 0,2 l | 2,4 ml/l | 0,12 ml/l |
| Incidin 3 | bis 3% | bis 0,1 l | 0,6 ml/l | 0,03 ml/l |
| Master Mix Environ | bis 2% | keine Angaben; 0,1 l angenommen | 0,4 ml/l | 0,02 ml/l |
| Orbivet | bis 3% | bis 0,1 l | 0,6 ml/l | 0,03 ml/l |
| Thegodor 73 | bis 3% | bis 0,1 l | 0,6 ml/l | 0,03 ml/l |

Erläuterungen:

1) Es wird angenommen, daß das gesamte verwendete Desinfektionsmittel in eine Tagesration Gülle gelangt und daß eine Stallung vollständig desinfiziert wird.

2) Berechnet für Stallungen mit Teilspaltenboden in der Schweinemast. Hier liegt der Platzbedarf bei durchschnittlich 1,1$m^2$ pro Tier (bei 20 bis 100kg Gewicht). (Angabe aus Wenner, 1973). Bei einem Durchschnittsgewicht von ca. 70kg/Tier ergibt sich ein Platzbedarf von 7,7$m^2$ pro GV. Die Güllproduktion liegt bei ca. 40l/GV und Tag; hieraus ergibt sich eine Güllemenge von ca 5,2 l/$m^2$ und Tag. Dieser Wert wurde der Berechnung der Desinfektionsmittelkonzentration in der Gülle zugrunde gelegt.
In Stallungen mit Vollspaltenböden verringert sich die mögliche Höchstkonzentration geringfügig, da hier die Tiere enger stehen und daher der Güllenfall pro $m^2$ größer ist.

3) Beim Einbringen der mit Desinfektionsmittel vermischten Gülle in den Faulraum wird die Konzentration von Desinfektionsmittel durch Verdünnung verringert; für diese Berechnung wurde eine Haltezeit von 20 Tagen angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. O. Kandler von Mai 1979 bis Dezember 1983 angefertigt.

Herrn Prof. Dr. O. Kandler danke ich für großzügige Unterstützung, für viele hilfreiche Diskussionen und wertvolle Ratschläge sowie für das Interesse, das er meiner Arbeit stets entgegengebracht hat.

Für die sachkundige Unterstützung beim Aufbau und Betrieb der Kleinfermenteranlage sowie für nutzbringende Anregungen sei Herrn Prof. Dr. J. Winter herzlich gedankt.

Bei Herrn Prof. Dr. K.O. Stetter bedanke ich mich für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis die ATP-Bestimmungen durchführen zu können.

Frau G. Willig danke ich für gewissenhafte Assistenz bei einigen Versuchen sowie für die Betreuung der Stammsammlung.

Herrn Dr. N. Weiß danke ich für seine wertvollen Hinweise für die Gaschromatographie.

Bei Herrn Dr. habil. R. Hensel, Frau Dr. P. Pohl und den Herren U. Temper, H.P. Kreißl, E. Soutschek und W. Demharter bedanke ich mich herzlich für viele offene und fruchtbare Gespräche.

Schließlich möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe und den Mitarbeitern am Botanischen Institut meinen besonderen Dank für das freundliche Arbeitsklima ausdrücken.

Ein großes Dankeschön auch an Ursula für's Tippen.

# L e b e n s l a u f

| | |
|---|---|
| Name | Reinhold Hilpert |
| Geburtsdatum | 6. April 1952 |
| Geburtsort | Kaufbeuren im Allgäu |
| Eltern | Heinz und Elfriede Hilpert |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | ledig |

## Schulausbildung

| | |
|---|---|
| Herbst 1958 bis Sommer 1962 | Ev. Schraderschule in Kaufbeuren |
| Herbst 1962 bis Frühjahr 1971 | Staatl. Gymnasium Kaufbeuren, humanistischer Zweig |
| Sommer 1971 | Abitur |

## Wehrdienst

| | |
|---|---|
| Herbst 1971 bis Herbst 1972 | Grundausbildung in Landsberg/Lech, danach Geb. Art. Btl. 81 in Kempten/Allg. |

## Studium

| | |
|---|---|
| Herbst 1972 bis Sommer 1977 | Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| Sommer 1977 | Diplomprüfung |
| Herbst 1977 bis Winter 1978 | Diplomarbeit im Fach Genetik bei Professor Dr. W. Klingmüller an der Universität Bayreuth |

## Promotion

| | |
|---|---|
| Seit Frühjahr 1979 | Promotion am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik der LMU München unter der Leitung von Professor Dr. O. Kandler<br>Während dieser Zeit Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft |